

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Biología Molecular



# Papel de calcineurina en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca patológica

Tesis Doctoral

Noelia Lozano Vidal

Madrid, 2015



Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid



“Papel de la ruta CN/NFAT en el desarrollo de  
hipertrofia cardiaca patológica”

Noelia Lozano Vidal  
Licenciada en Bioquímica

Tesis dirigida por:  
Juan Miguel Redondo Moya  
Sara Martínez Martínez

Madrid, 2014

*A mi hermano **Isaac***

“[La ciencia] nunca resuelve un problema sin crear diez más”.

George Bernard Shaw

“El héroe inicia su aventura desde el mundo de todos los días hacia una región de prodigios sobrenaturales, se enfrenta con fuerzas fabulosas y gana una victoria decisiva: el héroe regresa de su misteriosa aventura con el poder de otorgar dones a sus semejantes”.

Joseph Campbell, *El héroe de las mil caras*, 1949

## AGRADECIMIENTOS

Hace ya casi seis años que llegué a Madrid buscando mi camino. Hacía dos que había terminado la licenciatura y que, desmotivada, había decidido enfocar mi carrera profesional en el ámbito no científico. Sin embargo, en ese tiempo me di cuenta de que mi vida no estaba llena, de que faltaba algo, la ilusión y la pasión que nos nutre a los científicos a la hora de hacer nuestro trabajo, la creatividad inherente a nuestra labor, el saber que lo que hacemos lo hacemos por algo mucho más grande que nosotros. Me despedí de la empresa en la que trabajaba e hice las maletas, aterrizando en un Madrid veraniego y sofocante, donde encontré por fin mi camino. Este camino, como el del héroe de Joseph Campbell, no fue sencillo, sino que hubo momentos duros y frustrantes; pero, sobre todo, estuvo lleno de aventuras, de descubrimientos y de belleza. He caminado junto a compañeros de viaje que me han enseñado lecciones vitales inigualables. Y, tras seis años de caminar, ha llegado el momento decisivo.

El primer agradecimiento está dedicado a mi mentor, **Juan Miguel Redondo**, por encontrarme al inicio del camino y confiar en que quería recorrerlo por completo, por creer en mí cuando muchos no lo hacían, por darme esta oportunidad maravillosa. Gracias, porque gracias a ti he llegado hasta aquí, he vuelto a creer en mí misma y he aprendido tantísimo. Gracias por apoyarme en mis inquietudes, por tu paciencia conmigo, por preocuparte de mi bienestar y mi futuro. Muchas gracias, Juanmi.

**Sara**, mi co-directora, gracias por trabajar conmigo en este proyecto que hoy presento, y que es tanto tuyo como mío. Si no hubiera sido por ti, no sé qué habría hecho en los momentos de mayor angustia. Tu callada lealtad, tu calma, tu honestidad y tu integridad han sido un ejemplo para mí. Nunca olvidaré todo lo que me has enseñado, ni las cañas de la una menos cuarto donde te fui descubriendo como persona y amiga.

A mis compañeras en este proyecto: **Loli**, gracias por hacerme fuerte frente a la adversidad. De ti aprendí la diferencia fundamental entre el trabajo bien hecho y el que no lo está, y la importancia del respeto, el esfuerzo y la rigurosidad. **Ali**, gracias por ayudarme con tus expertos cortes y tinciones, y por los cotilleos y las risas que hemos compartido en la máquina de la parafina.

**Pablo**, gracias por las conversaciones sobre política y economía en el comedor. Me has librado unas cuantas veces de tener que intentar conversar sobre cosas “sin sustancia”, de esas que tanto me gustan, jajaja. Te deseo un futuro brillante, profesor.

**Nerea**, gracias por tu amistad durante estos años. He aprendido de ti tantas cosas... creo que ya lo sabes. Aunque el camino ha sido duro para las dos, nos hemos enriquecido la una a la otra, y no te olvidaré.

**Jorge**, Mr. Adams, gracias por tu ayuda con la administración intrayugular, y por dejarme formar parte de tu proyecto. No te olvides de que eres especial, no dejes que nadie te haga sentir lo contrario.

**Silvia**, contigo he aprendido a perseguir lo que realmente quiero. Me sorprendiste desde aquel primer Cicerone por tu aguda inteligencia. Sigue así siempre.

**Bea**, eres la chica más positiva del laboratorio y te tengo un cariño especial. Gracias por tu sonrisa por la mañana, por escucharme cuando estaba triste, por tus consejos, por ayudarme cuando estaba saturada y no daba para más.

Ay, **Ruth**, qué risas he pasado contigo, madre mía... Eres única y tus historias siempre hicieron de la sobremesa un sitio del que no querer marcharse nunca. Gracias por hacerme reír hasta que me dolía la cara.

**Rhiannon**, you are new in the lab, but these months together showed me that you are for sure an incredible and brave person. And your name is Celtic, so you must be a perfect adventure companion. Thanks!

**Cris**, co-cumpleañera, espero que el viaje que tú empiezas ahora sea tan bueno y gratificante como ha sido el mío, o más. Que aprendas todo lo que puedas y que uses lo aprendido para crecer como persona.

Gracias a **Miguel Campanero** y a **Ángel Luis Armesilla** por sus útiles consejos en las reuniones de los martes y a **Jesús Borreguero**, **Ana Vanesa** y **Lorena** por su trabajo fantástico con las ecocardiografías. Sin vuestra sabiduría científica no lo habría conseguido.

**Antonio Quesada**, manager y amigo, gracias por escucharme, por preocuparte por mí cuando estuve sola en Madrid y por enseñarme tantos sitios guays para salir. A **Laura** gracias por tu compañía y trabajo. A **Almu** y **Edu**, por estar siempre ahí con una sonrisa para echar una mano con los trámites y papeleos. A esos geniales técnicos de animalario, mis amigos y compañeros **Andrea**, **Juanjo**, **Mariajo**, **Bahia** y **Eli**, gracias por vuestro apoyo, trabajo y dedicación, y por enseñarme pacientemente cuando empecé y no sabía ni coger un ratón en la mano.

Gracias a todas las personas maravillosas que han pasado por el laboratorio durante estos años, tantas que no podría nombrarlas a todas. Gracias sobre todo a **Raquel** y **Felipe** por enseñarme tantas técnicas que hoy conozco, a **Van** por ser amiga, paño de lágrimas y confidente, a **Arantza** por hacerme ver lo mucho que valgo, a **María** por los desayunos y las charlas, a **Gemma** por los “cardios” y a **Katia** y **Amelia** por mostrarme el valor de la integridad. Tengo que agradecer

a los alumnos que he tenido (**Leti**, **Carlos Martí** y **Carlos Ferrera**) por ser los mejores del mundo y mostrarme lo que me gusta enseñar a otros.

Quiero agradecer a todo el personal CNIC con el que he trabajado, por vuestra profesionalidad y ayuda. Especialmente quiero agradecer a mis compañeros del **CNIC PhDay** por compartir conmigo esa aventura de montar un congreso de la nada. **Bárbara**, te admiro muchísimo y espero trabajar contigo en el futuro. Gracias a **Carlos Luque** por compartir conmigo profundas charlas sobre el mundo en las prácticas de Bioquímica que impartimos juntos. **Toñi**, conocerte es una de las experiencias más apasionantes que he vivido en mi vida. Hemos tardado demasiado en empezar a conocernos; pero espero que ahora que te tengo en mi vida no te vayas nunca, *my soulmate*.

To all the people from Roger Hajjar's lab in MSSM in New York, thanks for the amazing time that I spent there and all that I learnt, especially **Patricia**, **Erik** and **Roger** himself. Thanks for believing in me. **Patricia**, gracias por tu compañía y tu cariño. Nunca olvidaré la motivación que me has dado para seguir luchando por mi carrera.

Pero no sólo del terreno profesional salieron los compañeros de este viaje. Mucha gente, a nivel personal, ha contribuido a hacer de estos los años más importantes de mi vida.

Gracias a mi madre, **Chelo**. Eres un ejemplo a seguir de honestidad y ética personal. La historia de tu vida es una enseñanza de valor, entereza, dignidad e independencia. Gracias por enseñarme a ser individualista, autosuficiente, imparcial y rigurosa con los que me rodean. Sé que muchas veces te he traído por la calle de la amargura y que no he sido la mejor hija, que te he decepcionado y que "quien me entienda que me compre"; pero, a cambio, siempre has estado a mi lado cuando el cielo se caía sobre mi cabeza. Te quiero, mamá.

Gracias a mi padre, **Quico**. Siempre nos peleamos porque nos queremos muchísimo, como dijiste una vez. Tú me enseñaste a ser fiel a mí misma, a no permitir que nadie me compre, a fiarme de mis instintos, a ser una guerrera. Tú me enseñaste lo que es el honor y el amor propio, dos cualidades que hoy están devaluadas pero que son más importantes que nunca. Gracias por enseñarme el valor del trabajo duro y por este apellido precioso que llevo por bandera.

Gracias a mi hermana **Laura**, por ser mi otro yo, porque "somos una persona partida en dos", porque has estado a mi lado toda mi vida, por ser un ejemplo de superación personal; estoy orgullosa de la mujer fuerte e independiente en la que te has convertido. Te admiro y te quiero. Gracias a mi hermano **Isaac**, porque aunque te fuiste demasiado pronto, siempre te sentí cerca de mí, guiándome allá donde estés; hoy, sin embargo, te digo adiós para seguir sola mi camino. A mis dos hermanos: "He aquí el más profundo secreto que nadie conoce / (he aquí la raíz de la raíz



y el brote del brote / y el cielo del cielo de un árbol llamado vida; / que crece más alto de lo que un alma puede esperar / o una mente puede ocultar) / y éste es el prodigio que mantiene a las estrellas separadas. / Llevo tu corazón (lo llevo en mi corazón)<sup>1</sup>".

Gracias a **Pelayo**, mi gran amor, mi mejor amigo y mi compañero de viaje; valiente, admirable, lleno de optimismo y fuerza. Ocho años después de conocerte sigues sorprendiéndome, eres "*a dreamboat sailing in my head*". Todo lo que te escriba aquí es poco para lo mucho que eres para mí. Gracias por quererme tanto, por llenar mi vida de alegría, por poder hablar contigo de todo y por enseñarme a ver el mundo como una divertida y brillante oportunidad. Soy afortunada por tenerte a mi lado, y espero completar todos los caminos de nuestra vida contigo. Te quiero.

Gracias a mi familia **Lozano**, los "carboneros", por ser divertidos, originales, leales y humildes en su grandeza personal. Sois el ejemplo de lo que es una familia de verdad, y muchas veces sólo el saber que iba a verlos pronto me hacía sentir segura y feliz. Sólo espero que sigamos reuniéndonos cada año para vernos como siempre. Gracias sobre todo a mis padrinos, **Tilde** y **Narciso**, por hacer de segundos padres, y a mis primos (los veintitantos que sois) por quererme como soy. Gracias a mi familia **Vidal**, por cada verano de mi infancia, por la matanza en Navidades, por darme esta personalidad cabezota sin remedio y porque de vosotros aprendí a tener encendidas conversaciones en la sobremesa. Especialmente, gracias a mi abuela **Goya**, y a mi tía **Beni** por haber sido para mí una hermana mayor cuando la necesitaba. Hoy quiero recordar a esas personas de mi familia que se fueron antes de tiempo, dejando un triste hueco en mi corazón, mis primos **Nuria** y **Juanjo**.

A León, la tierra que me vio nacer, porque "Esto es lo que te da tu fuerza, la tierra roja de Tara"<sup>2</sup>.

A mi familia política, gracias por hacerme sentir una más de la familia. A mi fallecido suegro, **Pelayo**, por ser un referente intelectual en mi vida y uno de los pocos profesores de la carrera que merecían la pena; a mi suegra **Menchu**, por quererme como a otra hija; a **Pati**, por dejarme ser madrina de su hijo; a **Eugenio**, por su hospitalidad y su amabilidad conmigo; a **Alexchan**, por nuestras salidas nocturnas y las risas que nos echamos. A mis sobrinos, **Kathi** y **Axel**, porque con vuestras risas infantiles y vuestros juegos ilumináis mi mundo.

---

<sup>1</sup> E.E.Cummings, "Llevo tu corazón conmigo" (1952).

<sup>2</sup> "Lo que el viento se llevó", 1939.

A mis amigos del Banco de España, gracias por tener siempre un plan divertido en mente y haber sido mis verdaderos amigos aquí en Madrid; sobre todo a ti, **Bayaya**, que siempre te he tenido ahí cuando necesitaba descansar de este camino.

A mis amigos de Asturias: **María José**, Pepi, gracias por ser mi “muy mejor amiga”, por haberme defendido cuando eran injustos conmigo, por las noches de baile y tequilas. Ojalá te hubiera conocido antes en mi vida. **Cristina**, por 24 años de amistad y charlas yendo juntas a clase. **Cristian**, por ser una pareja de baile fabulosa y un terremoto en mi vida. **Medellia**, gracias por tu espontaneidad, tu mente abierta, tu creatividad galopante y tus historias que hacen que me parta de risa. **Álvaro**, por no olvidarme a pesar del tiempo y la distancia. A los **Invasores Kea** y los de **Odisea Astur**, por descubrirme el mundo de los juegos de rol.

A mis amigos de Liverpool, **Roberto**, **Cristina** y **César**, porque hicisteis de agosto del 2002 el mejor mes de mi vida. A **Clarissa**, tú hiciste de la “experiencia finlandesa” algo soportable y divertido. To **Mandy**, **Sere**, **Vicky** and **Sevi**, thanks for turning New York into an amazing adventure.

A los profesores que han marcado mi vida, en el instituto Montevil, **Salvador**, **Ana Martín**, **Aída**, **Julián** y **Ana Ceballos**, entre otros, y en la Universidad de Oviedo, **Ricardo Sánchez**, **Ramón Liz**, **Carlos López Otín** y **Benjamín Manzanal**. Vosotros me inspirasteis y me motivasteis en un mundo en el que ser como soy es una desventaja. Gracias a vosotros he llegado hasta aquí y soy la mujer que soy. *Tú me enseñaste a volar / con alas de pajarillo / cuando no era más que un niño / sin miedo a la libertad...*<sup>3</sup>

Por último, no puede haber héroe ni aventura sin némesis que vencer. Gracias a todos los que intentasteis que no lo consiguiera, los que no creísteis en mí, los que me hicisteis daño. Para mí nunca fue verdad aquello de que el mayor desprecio es no hacer aprecio, y como tal me comporté en la batalla. Espero que apreciarais mi valor y mi rectitud en ella. Gracias por llenarme de fuerza y determinación, y porque por vosotros esta victoria es más dulce si cabe.

Noelia

Madrid, 12 de diciembre de 2014

---

<sup>3</sup> Maximino Carchenilla, “Tú me enseñaste a volar”

# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN/SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>13</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>15</b>
<b>LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR CALCINEURINA/NFAT</b>	<b>17</b>
La calcineurina	17
Las proteínas NFAT	18
Activación de la ruta de señalización CN/NFAT	19
Inhibición de la ruta de señalización CN/NFAT	21
<i>Inhibidores farmacológicos de CN</i>	21
<i>Inhibidores endógenos de CN</i>	22
<i>Péptidos basados en secuencias de unión CN/NFAT</i>	22
<b>HIPERTROFIA CARDIACA</b>	<b>24</b>
Anatomía y fisiología del corazón	24
La hipertrofia cardiaca como respuesta fisio-patológica	26
La ruta de señalización CN/NFAT en hipertrofia cardiaca	28
La Angiotensina II y la ruta CN/NFAT en el corazón	31
<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>EXPERIMENTACIÓN ANIMAL</b>	<b>41</b>
Animales	41
Modelo <i>in vivo</i> de hipertrofia cardiaca	42
Terapia génica con virus	43
Medida de presión arterial y ecocardiografía	44
<b>GENERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES</b>	<b>44</b>
Vectores lentivirales	44
Vectores adeno-asociados 9	46
<b>EXPERIMENTOS IN VITRO</b>	<b>47</b>
Cultivos celulares	47
Ensayos de expresión de la proteína GFP	51
Ensayos in vitro de inhibición de la ruta CN/NFAT: western blotting y ensayos reporteros de luciferasa	51
<b>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TISULARES Y WESTERN BLOTTING</b>	<b>51</b>
Extracción de proteína total de tejidos	51
<i>Western blotting</i>	51
<b>EXTRACCIÓN DE RNA Y PCR CUANTITATIVA</b>	<b>51</b>



<b>PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS</b>	<b>53</b>
Detección de fibrosis mediante tinción con Picrosirius Red (PSR)	53
Análisis del área celular mediante tinción con lectina fluoresceinada	53
Detección de proteína GFP mediante inmunohistoquímica	54
<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>55</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>ESTUDIO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN CN/NFAT EN EL DESARROLLO DE HIPERTROFIA CARDIACA</b>	<b>59</b>
La ruta CN/NFAT es activada en el corazón por AngII	59
La inducción de hipertrofia cardiaca mediada por AngII es dependiente de CN	60
<i>El tratamiento con CsA previene el desarrollo de hipertrofia cardiaca inducida por AngII</i>	60
<i>La delección selectiva del gen Cnb1 en cardiomiocitos inhibe la inducción de hipertrofia cardiaca y fibrosis mediada por AngII</i>	64
<i>La función cardiaca no es alterada por la inhibición o ausencia de CN cardiaca</i>	69
Estudio cinético de la hipertrofia cardiaca mediada por AngII	71
Análisis del papel de CN en la expresión de colágenos y la activación de la ruta TGFβ	72
<b>TERAPIA GÉNICA CONTRA LA RESPUESTA HIPERTRÓFICA CARDIACA MEDIADA POR CN</b>	<b>74</b>
Expresión transgénica cardiaca vía transducción lentiviral	74
Vectores adeno-asociados producen la inhibición de la ruta CN/NFAT <i>in vitro</i> e infectan el corazón <i>in vivo</i>	77
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>81</b>
Angiotensina II y la activación de la ruta calcineurina/NFAT en el corazón	84
Efectos de la delección de la CN cardiaca en el desarrollo de hipertrofia cardiaca en adultos	86
El tratamiento único con CsA no induce alteraciones en el sistema cardiovascular	88
Activación de la ruta de TGFβ en las etapas tempranas del desarrollo de hipertrofia cardiaca	90
Terapia génica cardiaca frente a la activación de calcineurina	91
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>95</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>99</b>

## ABREVIATURAS



<b>AAV9</b>	Virus adeno-asociado serotipo 9
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>AKAP79</b>	Proteína de anclaje quinasa A 79 ( <i>A-Kinase Anchoring Protein 79</i> )
<b>Akt</b>	Proteína quinasa B ( <i>Protein Kinase B</i> )
<b><math>\alpha</math>MHC</b>	Cadena pesada de la miosina alfa ( <i>alpha-Myosin Heavy Chain</i> )
<b>ANF</b>	Factor natriureético atrial ( <i>Atrial Natriuretic Factor</i> )
<b>AngI</b>	Angiotensina I
<b>AngII</b>	Angiotensina II
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AP-1</b>	Proteína activadora 1 ( <i>Activator Protein 1</i> )
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>AT1/AT2</b>	Receptor de Angiotensina 1 / 2
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b><math>\beta</math>MHC</b>	Cadena pesada de la miosina beta ( <i>beta-Myosin Heavy Chain</i> )
<b>BNP/Nppb</b>	Péptido natriurético cerebral ( <i>Brain Natriuretic Peptide</i> )
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>Cabin/Cain</b>	Proteína de unión a calcineurin ( <i>Calcineurin-Binding Protein</i> )
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CaMKII</b>	Calmodulina quinasa 2
<b>CBA</b>	Actinina beta de pollo ( <i>Chicken beta-Actinin</i> )
<b>CHP</b>	Proteína de unión a calcio P22 ( <i>Calcium binding protein P22</i> )
<b>CK1</b>	Caseína quinasa 1
<b>CMLV</b>	Células de músculo liso vascular
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CN</b>	Calcineurina
<b>CnA</b>	Calcineurina subunidad A
<b>CnA<math>\beta^{-/-}</math></b>	<i>Knock-out</i> para Calcineurina subunidad A, isoforma beta
<b>CnB</b>	Calcineurina subunidad B
<b>Col1a1</b>	Colágeno 1 alfa 1
<b>Col3a1</b>	Colágeno 3 alfa 1
<b>Cox2</b>	Ciclooxygenasa 2
<b>Cq</b>	Ciclo de cuantificación
<b>Cre</b>	Recombinasa Cre
<b>CsA</b>	Ciclosporina A
<b>CsA+AngII</b>	Ciclosporina A + Angiotensina II
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo ( <i>Connective Tissue Growth Factor</i> )
<b>CyPA</b>	Ciclofilina A
<b><math>\Delta</math> (delta)</b>	Alelo deleciónado
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>Drp1</b>	<i>Dinamin-related protein 1</i>

<b>dsAAV</b>	Vector adenoasociado de cadena doble o complementaria ( <i>double-stranded AAV</i> )
<b>DYRK</b>	<i>Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A</i>
<b>ECA</b>	Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>EF</b>	Fracción de eyección
<b>EGR</b>	<i>Early growth response protein</i>
<b>ERT2/Esr1</b>	Receptor mutado de estrógenos
<b>FC</b>	Frecuencia cardiaca
<b>FK506</b>	Tacrolimus
<b>FKBP</b>	Proteína de unión a FK506
<b>flox</b>	Secuencia flanqueante Lox
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GFP-LxVP</b>	Proteína verde fluorescente fusionada a LxVP
<b>GSK3</b>	Glicógeno sintasa quinasa 3 ( <i>Glycogen Synthase Kinase 3</i> )
<b>HW/BW</b>	Peso del corazón / Peso del cuerpo ( <i>Heart Weight/Body Weight</i> )
<b>HW/TL</b>	Peso del corazón / Longitud de la tibia ( <i>Heart Weight/Tibia Length</i> )
<b>ICER</b>	<i>Inducible cAMP Early Repressor</i>
<b>IL6</b>	Interleucina 6
<b>Io</b>	Ionóforo de calcio
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.v.</b>	intravenoso
<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-trifosfato
<b>IP3R</b>	Receptor de inositol trifosfato
<b>Iso</b>	Isoproterenol
<b>IVS</b>	Septo intraventricular ( <i>Intraventricular Septum</i> )
<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal ( <i>c-Jun N-terminal Kinase</i> )
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>KDa</b>	KiloDaltons
<b>LoxP</b>	Secuencias flanqueante Lox
<b>LV</b>	Lentivirus
<b>LVIDd</b>	Diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole ( <i>Left Ventricular Internal Diameter, diastolic</i> )
<b>LVIDs</b>	Diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole ( <i>Left Ventricular Internal Diameter, systolic</i> )
<b>LVPW</b>	Pared posterior del ventrículo izquierdo ( <i>Left Ventricular Posterior Wall</i> )
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógeno ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )
<b>MEF2</b>	Factor potenciador específico de miocito 2 ( <i>Myocyte Enhancer Factor-2</i> )
<b>MLEC</b>	Células endoteliales de pulmón de ratón
<b>MOI</b>	Multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of Infection</i> )
<b>Myh6</b>	Cadena pesada de la miosina alfa ( <i>alpha myosin heavy chain</i> )
<b>NES</b>	Secuencia de exportación nuclear ( <i>Nuclear Exportation Sequence</i> )
<b>NFAT</b>	Factor nuclear de células T activadas ( <i>Nuclear Factor of Activated T cells</i> )
<b>Nkx2.5</b>	Proteína homeobox Nkx-2.5
<b>NLS</b>	Secuencia de localización nuclear ( <i>Nuclear Localization Sequence</i> )
<b>Nppb</b>	Péptido natriurético cerebral ( <i>Brain Natriuretic Peptide</i> )
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud



<b>pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEI</b>	Polietinilimina
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa ( <i>Phosphoinositol 3-Kinase</i> )
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( <i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i> )
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C ( <i>Protein Kinase C</i> )
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C ( <i>Phospholipase C</i> )
<b>PLN</b>	Fosfolamban ( <i>Phospholamban</i> )
<b>PMA</b>	forbol miristato acetato ( <i>phorbolmyristate acetate</i> )
<b>PP1</b>	Proteína fosfatasa 1
<b>PP2A</b>	Proteína fosfatasa 2 A
<b>PP2B</b>	Proteína fosfatasa 2 B
<b>PP2C</b>	Proteína fosfatasa 2 C
<b>qPCR</b>	PCR cuantitativa
<b>RCAN</b>	Regulador de Calcineurina
<b>RLU</b>	Unidades relativas de luminiscencia ( <i>Relative Luminiscence Units</i> )
<b>RT-PCR</b>	PCR de transcripción reversa ( <i>Reverse transcription PCR</i> )
<b>Ryr2</b>	Receptor de rianodina 2 ( <i>Ryanodin receptor 2</i> )
<b>Serca2</b>	ATPasa del Retículo Endoplásmico 2 ( <i>Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2</i> )
<b>SFFV</b>	<i>Spleen-focus forming virus</i>
<b>SGK1</b>	Quinasa regulada por glucocorticoides y suero 1 ( <i>Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1</i> )
<b>ssAAV</b>	Vector adenoasociado de cadena simple ( <i>single-stranded AAV</i> )
<b>SV40</b>	<i>Simian virus 40</i>
<b>TGFβ</b>	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
<b>Thbs1</b>	Trombospondina 1
<b>Tnc</b>	Tenascina C
<b>TRPC</b>	Canales transitorios receptores de potencial ( <i>Transient Receptor Potential Channels</i> )
<b>Tx</b>	4-hidroxi-tamoxifeno
<b>Veh</b>	Vehículo
<b>vg</b>	Genomas virales



## RESUMEN/SUMMARY



## RESUMEN

La hipertrofia cardiaca patológica es un mecanismo por el cual el corazón reduce el estrés que se produce en su pared a consecuencia de patologías como hipertensión arterial, infarto de miocardio o estenosis aórtica. Este mecanismo se manifiesta con un aumento del tamaño del corazón y del área de los cardiomiocitos, la aparición de fibrosis en el miocardio y de disfunción cardiaca. La relación entre la hipertrofia y la activación de la ruta CN/NFAT es conocida desde hace años a través de trabajos con animales transgénicos o *knock-out* para CN o miembros de NFAT y con el fármaco inmunosupresor CsA, un inhibidor de CN; sin embargo, no se conoce en detalle la cinética de activación de la ruta en esta patología, ni el papel exacto de la CN en ella en la edad adulta. A la vez, existe mucha variabilidad en los resultados obtenidos con CsA, y se ha reportado que CsA podría tener efectos secundarios en animales y humanos derivados de su acción en dianas que no son la CN.

Para circunvalar estos problemas, en este trabajo estudiamos esta patología en animales de genotipo silvestre y con delección condicional y cardioespecífica de CN, mediante un modelo de infusión de AngII. Los resultados indican que la inhibición con CsA de CN consigue reducir todos los parámetros de la hipertrofia cardiaca excepto la fibrosis; en cambio, los animales en los que inducimos delección genética de CN son capaces de inhibir también la fibrosis. Esto nos indica la importancia central de la CN en el desarrollo de la patología. Todos los animales tratados con AngII y co-tratados con CsA+AngII presentaban un aumento de la presión arterial. Esto sugiere que la hipertensión no es esencial en el desarrollo de la hipertrofia. Hemos comprobado que la activación de la ruta CN/NFAT es muy rápida tras la infusión de AngII, y que el fenotipo hipertrófico se produce tras 3 días de estimulación. También hemos observado que la delección genética de CN o su inhibición con CsA impactan diferencialmente en el perfil génico que AngII induce. En el caso de colágenos, y a pesar de que la delección de CN inhibía la fibrosis, sigue existiendo un aumento en su expresión, lo que sugiere que la presencia de CN en el cardiomiocito es necesaria en la deposición del colágeno producido en el tejido. Además, estudiamos una manera novedosa de inhibir el desarrollo de hipertrofia, usando el péptido inhibidor de CN, LxVP, por medio de vectores virales AAV9. Si bien la transducción que obtuvimos en el corazón fue alta, no conseguimos inhibir la activación de la ruta en su totalidad.



## SUMMARY

The pathological cardiac hypertrophy is a mechanism by which the heart reduces the stress in its wall, as a consequence of diseases as arterial hypertension, myocardial infarction or aortic stenosis. This mechanism occurs with an increase in the heart size and cardiomyocyte area, and the appearance of cardiac fibrosis and dysfunction. The relationship between hypertrophy and CN/NFAT pathway activation is known for years through several studies where the authors used transgenic or knock-out animals for CN or different NFAT members and immunosuppressive drugs as CsA, which inhibits CN; however, neither the kinetics of activation of the pathway in this pathology, nor the exact role of CN in it in the adult age are known. Also, there is high variability in the results obtained with CsA as inhibitor, and has been reported that CsA could give secondary effects in both animals and humans derived of interference with other targets than CN.

Therefore, we studied this pathology in wild type and conditional cardiospecific CnB knock-out mice, using an AngII-infusion model. The results indicate that CsA-mediated CN inhibition is able to reduce all features of cardiac hypertrophy except fibrosis; on the other hand, CnB deleted mice are able to inhibit fibrosis as well. This indicates the pivotal role of CN in the development of the pathology. All AngII- and CsA+AngII-treated animals presented an increase of blood pressure. This suggests that hypertension is not essential for the development of cardiac hypertrophy. Also, we have seen that the activation of CN/NFAT pathway is fast after the infusion of AngII, and that the hypertrophic phenotype is produced as soon as 3 days after the beginning of stimulation. Also, we have observed CnB deletion and CsA-mediated inhibition impact differentially in the AngII-induced gene expression profile. The case of collagens expression show us that, despite of fibrosis being inhibited by CnB deletion, there is still an increase in their expression, suggesting that the presence of CN in the cardiomyocyte is needed for the deposition of this collagen. Also, we studied a new approach to inhibit cardiac hypertrophy, using the CN inhibitory peptide, LxVP, delivered by viral vectors AAV9. We observed that, even with a high transduction achieved in the heart with this method, we couldn't inhibit completely the pathway activation.

# INTRODUCCIÓN



## LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR CALCINEURINA/NFAT

La ruta de señalización calcineurina/NFAT (CN/NFAT) se describió inicialmente como una ruta principal en la señalización durante la respuesta inmune. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha descubierto su importancia en otros muchos procesos fisiológicos y patológicos, desde el desarrollo embrionario hasta la senescencia y muerte celular (Crabtree and Olson, 2002, Hogan et al., 2003, Pan et al., 2013, Heit, 2007). A continuación se detallan las características de los dos componentes principales de la ruta, CN y NFAT, así como su mecanismo de acción.

### *La calcineurina*

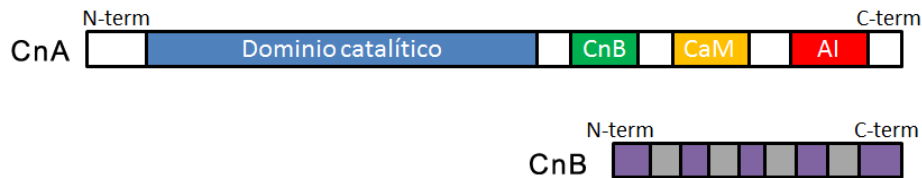
La calcineurina (CN) o proteína PP2B es una fosfatasa que se describió entre los años 70 y 80; (Klee et al., 1979, Stewart et al., 1983, Wang et al., 1999). Es una enzima altamente conservada evolutivamente, existiendo en levaduras y vertebrados superiores, y cuya expresión es ubicua (Rusnak and Mertz, 2000).

La CN pertenece a la familia de las proteínas fosfatasa serina/treonina, cuyos otros miembros son PP1, PP2A y PP2C. Estas proteínas dependen de distintos iones divalentes para ejercer su función y son capaces de desfosforilar a proteínas con grupos fosfato en residuos de serina o treonina. La CN es la única fosfatasa de esta familia cuya actividad depende de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (Rusnak and Mertz, 2000).

CN es un heterodímero compuesto por dos subunidades, la subunidad catalítica CnA y la reguladora CnB. En vertebrados existen 3 isoformas de CnA codificadas por otros tantos genes: CnA $\alpha$ , CnA $\beta$  y CnA $\gamma$ . Respecto a CnB, presenta 2 isoformas, CnB1 y CnB2. CnA $\alpha$  o  $\beta$  forman heterodímeros con CnB1, y su distribución es ubicua (con diferente abundancia relativa de CnA $\alpha$  y CnA $\beta$  según el tejido), mientras que el heterodímero formado por CnA $\gamma$  y CnB2 está restringido a los testículos.

Estructuralmente, CnA contiene un dominio amino-terminal catalítico de función fosfatasa, seguido por un dominio de unión a CnB, otro de unión a calmodulina (CaM), y finalmente, en el carboxilo-terminal, un dominio autoinhibidor. La estructura del sitio catalítico es una combinación de hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  entre las que se encuentra un motivo fosfodiesterasa que es el centro activo de la enzima. Cuando la CN esta inactiva el dominio autoinhibidor se pliega sobre el dominio catalítico impidiendo el acceso del sustrato al enzima. Por otro lado, CnB contiene en su estructura cuatro dominios EF que unen moléculas de  $\text{Ca}^{2+}$ , y

su unión a CnA confiere estabilidad al heterodímero. La unión de CnA y CnB es necesaria para la funcionalidad enzimática, ya que se ha demostrado que la pérdida de la subunidad CnB conduce a la degradación de la subunidad catalítica CnA y por tanto a la inactivación de la ruta (Klee et al., 1998, Parsons et al., 2004, Maillet et al., 2010, Graef et al., 2001b).

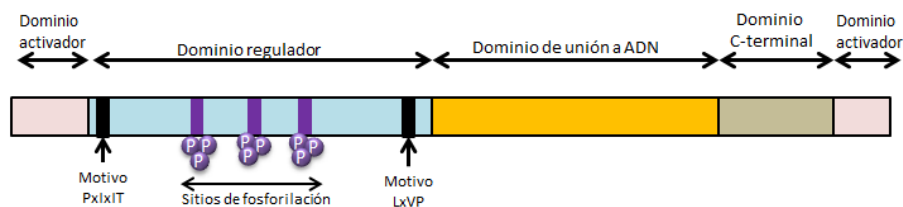


**Figura 1:** Estructura de la calcineurina subunidad A, con los dominios catalítico, de unión a calcineurina B (CnB), a calmodulina (CaM) y autoinhibidor (AI); y de la calcineurina subunidad B, con los dominios EF en gris. Adaptado de Rusnak *et al* (2000) y Li *et al* (2011).

Se han descrito numerosos sustratos de CN a lo largo de su historia, siendo los mejor caracterizados la familia de factores de transcripción NFAT. Además de estos, otros sustratos de CN descritos son la proteína tau y la tubulina (Goto et al., 1985), la neuromodulina (Seki et al., 1995), la óxido nítrico sintasa (Dawson et al., 1993), la distrofina (Michalak et al., 1996), MEF2 (Wu et al., 2001), la proteína pro-apoptosis BAD (Wang et al., 1999) y la proteína de fisión mitocondrial Drp1 (Cereghetti et al., 2008).

### Las proteínas NFAT

La familia de factores de transcripción *Nuclear Factor of Activated T cells*, o NFATs, se compone de cuatro miembros, NFATc1, c2, c3 y c4, y están relacionados evolutivamente con la familia Rel/NFκB (Graef et al., 2001a). Están regulados por CN y su función, inicialmente, se describió durante la activación linfocitaria. A veces se considera que existe un quinto miembro, NFAT5, cuya homología a los otros miembros sólo tiene lugar en el dominio de unión a ADN; pero no está regulado por CN y se activa en respuesta a estrés osmótico (Hogan et al., 2003).



**Figura 2:** Estructura de NFAT, con los dominios regulador, de unión a ADN y activadores. En el dominio regulador se observan los sitios de fosforilación, ricos en serinas, y los motivos de unión a CN, PxIxIT y LxVP. Adaptado de Hogan *et al* (2003).

Estructuralmente, los NFAT presentan dos dominios conservados. Próximo al extremo amino-terminal tienen un dominio regulador o región de homología de NFAT constituido por



varios motivos ricos en serinas, que están fosforiladas cuando el factor está inactivo. En este dominio regulador también se encuentran los dos motivos de unión a CN (PxIxIT y LxVP), así como las secuencias de localización/exportación nuclear (NLS y NES). La segunda región conservada es el dominio de unión a ADN, también llamada región de homología Rel por su similitud a los factores de transcripción de dicha familia. En los extremos amino y carboxilo-terminales, que son las regiones más variables, existen dominios de transactivación (Hogan et al., 2003).

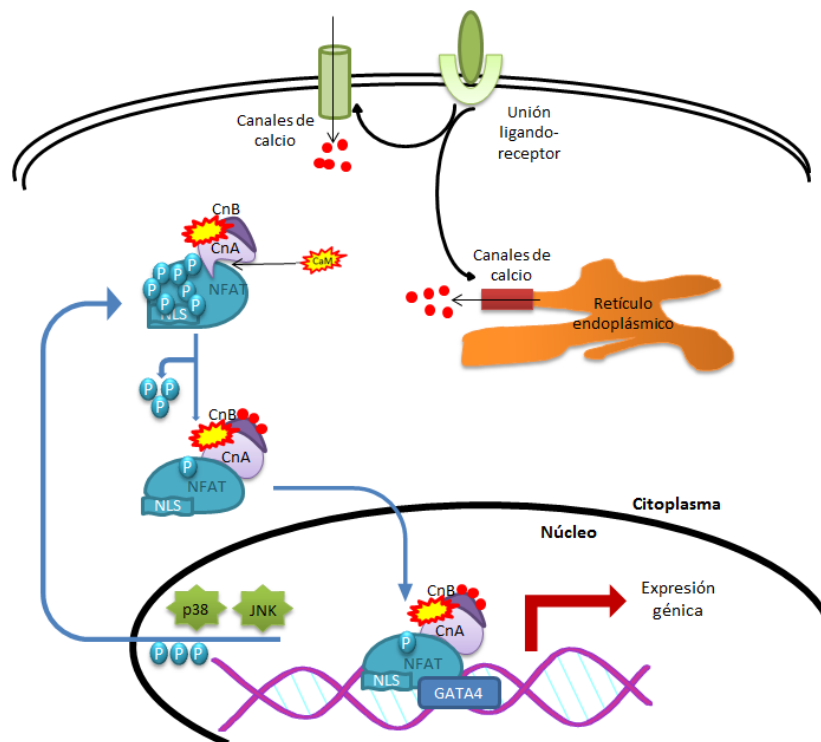
Dependiendo del tipo celular, podemos encontrar combinaciones diferentes de los factores NFAT. El porqué de la coexistencia de los cuatro factores ha sido estudiado, estudiándose si existe un mecanismo de redundancia al ser el dominio de unión a ADN homólogo entre ellos (Macian, 2005), o si cada miembro tiene una función exclusiva. Así, algunos trabajos han descrito diferencias funcionales entre factores NFAT sobre la regulación de la expresión génica (Yoshida et al., 1998, Xanthoudakis et al., 1996, Hodge et al., 1996, Cante-Barrett et al., 2007, Graef et al., 2001b, Urso et al., 2011, Wilkins et al., 2002, Bourajjaj et al., 2008).

NFAT coopera con otros factores de transcripción (ej: AP-1, GATA4, ICER, MEF2 o EGR) en las regiones promotoras de los genes que regula (Hogan et al., 2003, Decker et al., 1998, Nemer and Nemer, 2002, Molkenstein et al., 1998, Olson and Williams, 2000). También se ha descrito la formación de dímeros de NFAT dispuestos en forma de anillo alrededor de la doble hélice de ADN (Giffin et al., 2003).

### ***Activación de la ruta de señalización CN/NFAT***

En reposo, CN y NFAT se encuentran en el citoplasma celular, y NFAT está altamente fosforilado, ya que la CN está inactiva al estar el centro activo ocupado por su dominio autoinhibidor. Cuando la célula recibe estímulos externos que inducen incrementos en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , la proteína CaM se activa uniéndose a CN. Esta interacción produce un cambio conformacional de CN en el que el dominio autoinhibidor se desplaza del centro activo del enzima, lo que permite el acceso de sus sustratos. Así, las proteínas NFAT son desfosforiladas por CN provocando un cambio conformacional del factor que expone su secuencia de localización nuclear (NLS), y se transloca al núcleo. Una vez en el núcleo, NFAT se une a sus elementos de reconocimiento en los promotores de sus genes diana, regulando su transcripción (Hogan et al., 2003, Crabtree and Schreiber, 2009, Crabtree and Olson, 2002, Li et al., 2011). Cuando el estímulo activador cesa, NFAT se desactiva exportándose de nuevo al

citoplasma. Diversas quinasas tales como GSK3, CK1, DYRK, JNK y p38 se han descrito que participan en la restauración del estado de fosforilación de NFAT (Li et al., 2011, Gomez del Arco et al., 2000, Crabtree and Olson, 2002, Hogan et al., 2003, Crabtree and Schreiber, 2009).



**Figura 3: Esquema básico de la activación de la ruta CN/NFAT. Los puntos rojos representan los iones  $\text{Ca}^{2+}$  liberados en el citoplasma. CaM: calmodulina; NLS: Secuencia de Localización Nuclear; JNK: Quinasa c-Jun N-terminal.**

La interacción entre CN y NFAT es un requerimiento fundamental en la regulación de la activación de NFAT. A finales de los 90 se identificó la primera de las secuencias que regulan la unión a CN de NFAT, la secuencia consenso PxxIT (Aramburu et al., 1998), situada en el extremo N-terminal del dominio regulador de NFAT, y que se haya conservada en los cuatro miembros de la familia. La afinidad del motivo PxxIT por CN es baja, lo cual facilita que NFAT no sea constantemente activada, añadiendo otro punto de control a la activación de la ruta. La región de unión del motivo PxxIT en la CN se localiza en dominio catalítico de la CnA (Li et al., 2007). Los estudios cristalográficos (Li et al., 2007) y de resonancia magnética nuclear (Takeuchi et al., 2007) que determinaron esta región se realizaron usando el péptido VIVIT, que es una versión mejorada de la secuencia PxxIT con mayor afinidad por CN (Aramburu et al., 1999). La unión de VIVIT tiene lugar a través de las láminas  $\beta 11$  y  $\beta 14$  de CN. Recientemente, estudios cristalográficos han confirmado que secuencias PxxIT procedentes de otras proteínas que interaccionan con CN también se unen a esta región (Grigoriu et al., 2013, Li et al., 2012).

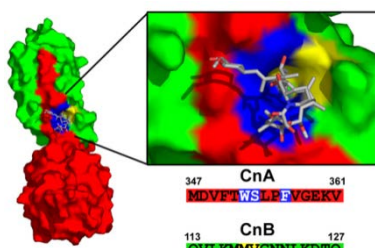


Figura 4: Modelo tridimensional de la unión de LxVP (en gris) a CN, que se produce en la unión de la subunidad A (rojo) y B (verde). Los residuos implicados en dicha unión se hayan resaltados en azul y amarillo. Adaptado de Rodríguez et al (2006).

En el extremo C-terminal del dominio regulador de NFAT se localiza el segundo motivo de unión a CN que contiene la secuencia consenso LxVP (Park et al., 2000, Liu et al., 2001). Esta secuencia esta moderadamente conservada entre los miembros NFAT. Los péptidos basados en las secuencias LxVP de los distintos miembros muestran diferencias en su capacidad para desplazar la interacción de CN a NFAT *in vitro*, lo que indica que las secuencias LxVP se unen a CN con distintas afinidades dependiendo del miembro de la familia (Martínez-Martínez et al., 2006). Los

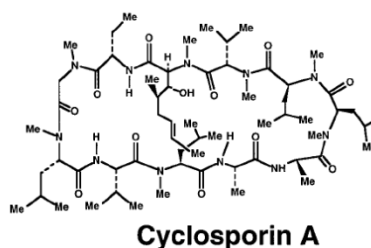
ensayos de competición de este estudio sugieren que el sitio LxVP de NFATc2 no sería funcional ya que presenta una afinidad casi nula por CN (Martínez-Martínez et al., 2006). A diferencia de la secuencia PxlIT, que es capaz de unirse a la subunidad CnA en ausencia de CnB, la secuencia LxVP requiere la presencia de la subunidad reguladora para interaccionar con CnA (Rodríguez et al., 2009). De hecho, se ha demostrado que LxVP se une a CN a través de un bolsillo hidrofóbico en la unión de CnA y CnB. (Rodríguez et al., 2009, Grigoriu et al., 2013).

## Inhibición de la ruta de señalización CN/NFAT

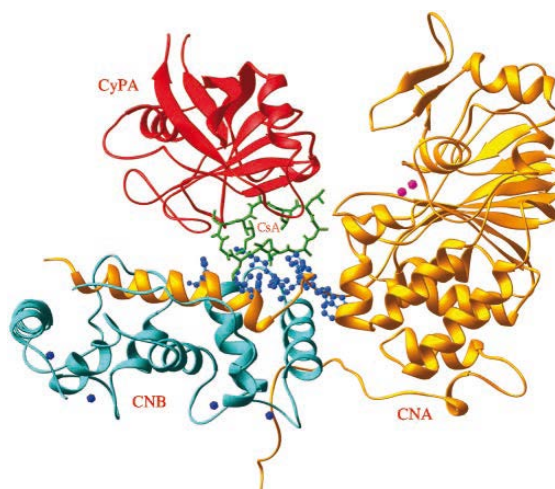
### Inhibidores farmacológicos de CN

Los fármacos inmunosupresores Ciclosporina A (CsA) y FK506 (también denominado tacrolimus) son los dos inhibidores exógenos de CN mejor caracterizados. El primero es un undecapéptido cíclico y fue aislado del hongo *Hypocladium inflatum gams*; el segundo es un trieno macrocíclico extraído de *Streptomyces tsukubaensis*. (Azzi et al., 2013, Martínez-Martínez and Redondo, 2004). Tras el descubrimiento de sus propiedades como inmunodepresores (Borel et al., 1976, Ochiai et al., 1987) ambos compuestos fueron objeto de estudio en numerosos trabajos con el fin descubrir su mecanismo de acción y con este conocimiento poder hacer frente a grandes retos de la Inmunología en los años 80. Ambos son compuestos lipofílicos que atraviesan la membrana plasmática de las células y su mecanismo de acción es similar a través de la inhibición de la actividad fosfatasa CN. En el citosol, CsA y FK506 se unen a sendas inmunofilinas (Ciclofilina A (CyPA) y FKBP, respectivamente), unas proteínas cuya función biológica es la catalización de reacciones isomerasa. Estos complejos CsA-CyPA o FK506-FKBP, se unen a la CN a través del dominio de unión a CnB, de forma que la unión se produce en la interfaz entre CnA y CnB (Huai et al., 2002), de forma similar a como se

describió posteriormente para LxVP (Rodriguez et al., 2009). Esta interacción del complejo inmunosupresor-inmunofilina con CN evita que los sustratos, entre ellos NFAT, puedan acceder al sitio activo y se desfosforilen por la enzima.



**Figura 5:** Estructura molecular de la Ciclosporina A (arriba), y modelo tridimensional (derecha) de la unión de CsA (verde, en el centro) unida a ciclofilina A (CyPA, rojo), con CN. Adaptado de Rusnak *et al* (2000), y Huai *et al* (2002), respectivamente.



El uso de CsA como fármaco inmunosupresor en la terapia de rechazo tras un trasplante de órgano mejoró sustancialmente la esperanza de vida de los órganos trasplantados y, por tanto, de los pacientes. (Kolata, 1983, Issa et al., 2013). Sin embargo, el tratamiento con estos inmunosupresores conlleva graves efectos secundarios derivados de su aplicación crónica, tales como nefrotoxicidad, hipertensión, neurotoxicidad y trastornos gástricos (Ekberg et al., 2007). Estos efectos secundarios pueden tener distintos orígenes, unos podrían ser dependientes de la propia inhibición específica de CN, ya que la ruta CN/NFAT regula otros muchos procesos biológicos en diferentes tejidos. Otros efectos podrían ser independientes de CN, entre ellos los debidos a su interacción con las inmunofilinas (Kiani et al., 2000). Se cree que uno de los efectores de la toxicidad de CsA es TGF $\beta$ , ya que su expresión y liberación está incrementada tras el tratamiento con CsA (Khanna et al., 1994, Hojo et al., 1999, Minguillon et al., 2005). TGF $\beta$  estimula la producción de componentes de la matriz extracelular y un descenso de las proteasas que la degradan, provocado un aumento en la fibrosis. Además, hay trabajos que apuntan a que CsA provoca la activación del sistema renina-angiotensina con un aumento de la producción de aldosterona (Bobadilla and Gamba, 2007), la estimulación de la producción de endotelina 1 (Abassi et al., 1996) y la activación del sistema nervioso simpático en el riñón (Azzi et al., 2013), que provocan hipertensión, y el aumento en la producción de radicales libres (Rezzani, 2006).

### ***Inhibidores endógenos de CN***

Existen diversas proteínas endógenas que son capaces de inhibir la función de la CN, por ejemplo AKAP79 (Kashishian et al., 1998), CHP (Lin et al., 1999), Cabin1/Cain (Sun et al., 1998) y las proteínas RCAN (Rothermel et al., 2000). Estas últimas forman una familia compuestas por tres miembros codificados por tres genes: RCAN1, 2 y 3. De esta familia, RCAN1 es el miembro mejor caracterizado y presenta dos isoformas, RCAN1.1 y RCAN1.4, cuya expresión depende de dos promotores alternativos. La expresión de RCAN1.1 es normalmente constitutiva mientras RCAN1.4 se induce transcripcionalmente a través de la activación de la ruta CN/NFAT (Yang et al., 2000). La expresión de RCAN1.4 se considera por tanto un mecanismo de retroalimentación negativa por el cual la activación de la ruta CN/NFAT produciría la expresión de esta proteína, y ésta a su vez inhibiría la activación de CN. Curiosamente, mientras los primeros trabajos de sobreexpresión de RCAN1 apuntaban en efecto a que esta proteína se unía e inhibía la actividad CN (Rothermel et al., 2000, Rothermel et al., 2001), posteriormente se observó que la delección de este gen *in vivo* podría ejercer un papel dual sobre la ruta, pudiendo tener también una función activadora (Vega et al., 2003, Sanna et al., 2006).

### ***Péptidos basados en secuencias de unión CN/NFAT***

En la búsqueda de inhibidores más específicos para la ruta CN/NFAT se han empleado péptidos basados en las secuencias de los motivos de unión de NFAT con CN, PxlIT y LxVP. Dichos péptidos son VIVIT y LxVP, respectivamente. VIVIT, con la secuencia MAGPHPVIVITGPHEE, fue diseñado como una mejora del motivo PxlIT, de forma que tiene una alta afinidad por CN, desplazando competitivamente a sustratos que se unan a ella mediante esta secuencia (Aramburu et al., 1999). En cambio, LxVP tiene la secuencia de su motivo en NFATc1, es decir, es un péptido de 15 aminoácidos con la secuencia DQYLAVPQHPYQWAK (Liu et al., 2001, Park et al., 2000).

La zona de interacción con CN de cada uno de estos péptidos distinta, por lo que su forma de inhibir la activación de CN es diferente. Así, VIVIT inhibe fuertemente la unión de sustratos a CN sin interferir con la actividad del enzima, mientras que LxVP compite tanto con la unión de sustratos como la actividad fosfatasa (Martinez-Martinez et al., 2006). Una ventaja importante frente a CsA es que los péptidos pueden realizar su función sin necesitar otra proteína endógena. Las características del péptido LxVP lo han hecho más atractivo de cara a un posible uso como inmunosupresor, por lo que ha sido ampliamente estudiado en nuestro

laboratorio. En primer lugar, fue objeto de estudio la afinidad del péptido por calcineurina (Martínez-Martínez et al., 2006) y el sitio de unión del motivo en la CN (Rodríguez et al., 2009). Durante los últimos años en nuestro laboratorio hemos usado el péptido LxVP para interferir en el desarrollo de diversas patologías en las que la ruta de CN/NFAT estaba implicada. Así, la expresión de LxVP empleando vectores lentivirales es capaz de inhibir el desarrollo de aneurismas aórticos abdominales (Esteban et al., 2011), el avance de lesiones ateroscleróticas (Mendez-Barbero et al., 2013) y tiene potencial terapéutico contra la artritis reumatoide y la hipersensibilidad (Escolano et al., 2014).

## HIPERTROFIA CARDIACA

El sistema circulatorio tiene la función biológica de distribuir la sangre por todo el cuerpo. El corazón es el órgano central del sistema circulatorio y está compuesto mayoritariamente por tejido muscular altamente vascularizado. Su función es el bombeo de la sangre a través de los vasos sanguíneos. Su importancia es tal que es uno de los primeros órganos en formarse y empezar a ejercer su función.

### *Anatomía y fisiología del corazón*

El corazón es un órgano de forma cónica, con cuatro cámaras huecas: dos ventrículos y dos aurículas. Los primeros sirven para eyectar la sangre fuera del corazón a través de arterias; las últimas para recibirla desde las venas. El corazón presenta bilateralidad, de forma que tiene una aurícula y un ventrículo a la derecha y otro par de cámaras a la izquierda. El ventrículo y la aurícula de cada lado están comunicados por válvulas que permiten el paso de la sangre, mientras que las partes situadas a la izquierda y derecha del corazón no se comunican,

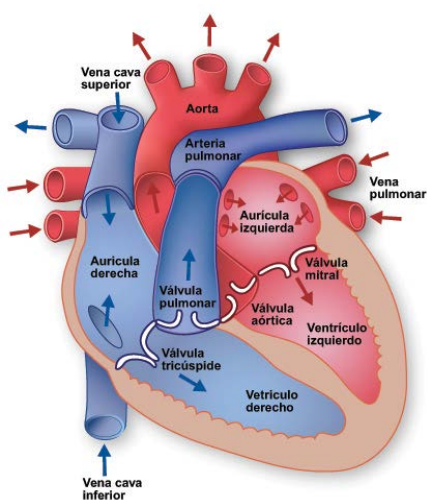


Figura 6: Anatomía del corazón humano. Adaptado de Texas Heart Association.

estando separadas por una pared muscular denominada septo. Se denomina ápex a la parte inferior del corazón, acabada en punta, y base a la parte superior del mismo.

La sangre accede al corazón por la aurícula derecha desde las venas cavas inferior y superior, después de pasar por todo el cuerpo oxigenando los tejidos y órganos. A través de la válvula tricúspide, la sangre pasa al ventrículo derecho, desde donde es bombeada a la arteria pulmonar hacia los pulmones. Allí, la sangre descarga el dióxido de carbono

procedente del metabolismo celular y se carga de oxígeno, volviendo al corazón a través de las cuatro venas pulmonares, para desembocar en la aurícula izquierda. La sangre ahora pasa al ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral. El ventrículo izquierdo es considerado la cámara principal y se va a encargar de impulsar la sangre, que saldrá por la válvula aórtica hacia la aorta, con suficiente fuerza para que circule por todo el cuerpo. (Anderson et al., 2004, Partridge and Anderson, 2009; 'laizzo, The Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices, 2009').

La clave de esta circulación de la sangre a través de las cámaras cardíacas es la existencia de movimientos rítmicos y automáticos de contracción y relajación, llamados sístole y diástole. Durante la sístole, los ventrículos se contraen, reduciendo su tamaño y volumen, por lo que la sangre contenida en ellos saldrá hacia sus respectivas arterias; la diástole, por el contrario, consiste en una relajación del músculo cardíaco o miocardio, que provoca un aumento de volumen acompañado de una caída de la presión. Esto hace que la sangre que hay en las aurículas tienda a pasar libremente hacia los ventrículos para igualar la presión entre ambas cámaras, llenando otra vez los ventrículos y reiniciando de nuevo el ciclo (Dini et al., 2013).

El corazón es un órgano complejo que está compuesto por varios tipos celulares: cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales y del sistema inmune. Los cardiomiocitos son las células más importantes y ocupan la mayoría del volumen del órgano; son células musculares estriadas y diferenciadas (Nadal-Ginard et al., 2003) que se encargan de los movimientos de contracción y distensión del corazón. Los cardiomiocitos son células grandes, en torno a 100-150  $\mu\text{m}$  de longitud y 20 to 35  $\mu\text{m}$  de anchura (Severs, 2000), y contienen gran cantidad de mitocondrias, que ocupan un 40% del volumen celular, para obtener ATP con el que poder desarrollar su función (Walker and Spinale, 1999). Los causantes del acortamiento celular que acaba produciendo la contracción coordinada del órgano completo son los llamados sarcómeros, entramados de proteínas (principalmente actina, troponina y miosina) que en los tejidos musculares permite la contracción de la célula. Este proceso se desencadena al producirse cambios de potencial de acción de membrana del cardiomiocito, que provocan la apertura de canales de calcio de tipo L sensibles a voltaje (LTCC). La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula es rápida y con un flujo bajo, lo que causa una activación de los receptores de rianodina (RyR2) que se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico (RE). Esta activación resulta en una salida masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE hacia el citoplasma, aumentando su concentración intracelular en 100 veces y provocando una serie de cambios conformacionales

en la troponina que permite que la miosina, previa hidrólisis de ATP, se deslice sobre la actina, acortando así la fibra muscular. El proceso termina mediante lo que se denomina “relajación activa”: la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE (Serca2) transporta el  $\text{Ca}^{2+}$  de nuevo al RE mediante hidrólisis de ATP, descendiendo la concentración citosólica de este ion a niveles de reposo. (Walker and Spinale, 1999, Torrent-Guasp et al., 2005, Heineke and Ritter, 2012).

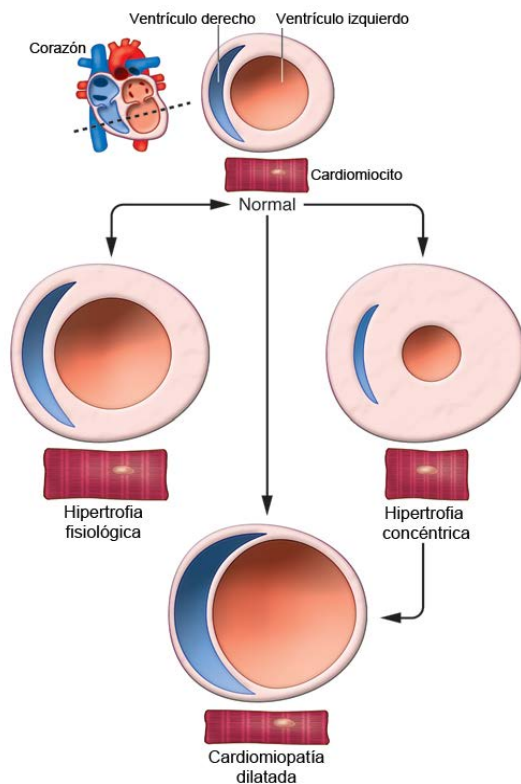
El corazón tiene una importancia primordial en el mantenimiento de la vida, siendo las enfermedades cardíacas o cardiopatías una de las causas principales de muerte en todo el mundo (Levy et al., 1990, Kannel, 2000; `Global status report on non-communicable diseases 2010, World Health Organization, 2011`). Por ello, en las últimas décadas, las cardiopatías han sido amplio objeto de estudio, tanto desde el punto de vista clínico como molecular. Muchas cardiopatías cursan con hipertrofia cardíaca, y aunque algunas de estas patologías hipertróficas son de tipo familiar debidas a causas exclusivamente genéticas, existe una hipertrofia cardíaca de tipo extrínseco, según la clasificación de la OMS (1995), cuyo desarrollo se debe a causas externas y patológicas.

### *La hipertrofia cardíaca como respuesta fisio-patológica*

La hipertrofia cardíaca es la respuesta del corazón a un aumento en estrés mecánico o humoral, con la finalidad de reducir dicho estrés en la pared. Esta respuesta consiste en un aumento en la masa del miocardio, de forma que pueda hacer frente a una mayor demanda de bombeo sanguíneo y conlleva un aumento en síntesis de proteína, en el tamaño de los cardiomiocitos y cambios en la organización de los sarcómeros.

Existen dos tipos de hipertrofia cardíaca: fisiológica y patológica. La primera ocurre como una adaptación a una situación en la que la persona necesita más aporte de sangre en su actividad diaria, como en el caso de deportistas o mujeres embarazadas. La segunda, en cambio, ocurre cuando se necesita una compensación frente a situaciones que comprometen el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular y el aporte de sangre, como por ejemplo, durante el infarto de miocardio, estenosis valvulares o hipertensión. Los dos tipos de hipertrofia se diferencian no sólo en sus causas, sino en sus características fenotípicas y en las rutas de señalización intracelular que están implicadas en su desarrollo. La hipertrofia fisiológica se activa a través de la ruta de PI3K y Akt, y conlleva un crecimiento excéntrico del ventrículo izquierdo, en el que se engrosan las paredes y aumenta el volumen de la cámara; no presenta fibrosis, ni expresión de genes de estrés (ANF y BNP) ni re-expresión de genes fetales





**Figura 7: Tipos de hipertrofia cardíaca, mostrando el aumento relativo de las paredes y el volumen ventricular y el crecimiento del cardiomiocito en cada caso. Adaptado de van Berlo *et al* (2003).**

( $\beta$ MHC), no causa disfunción cardíaca y es reversible al cesar el estímulo que lo provocó (Heineke and Molkentin, 2006, Maillet *et al.*, 2013).

En cambio, la hipertrofia patológica aparece como un mecanismo temporal para preservar la función ventricular y liberar a la pared cardíaca del estrés generado por situaciones patológicas. En etapas tempranas, el corazón tiene un crecimiento concéntrico, es decir, el engrosamiento de las paredes no está acompañado de aumento de volumen; para ello, los cardiomiocitos crecen en grosor, añadiendo sarcómeros en paralelo.

Sin embargo, la cronificación de esta situación conduce al desarrollo de una hipertrofia excéntrica con dilatación cardíaca,

en la que la cámara aumenta su volumen a costa de un adelgazamiento del miocardio. La dilatación cardíaca puede producirse directamente sin la existencia previa de una hipertrofia concéntrica, como ocurre a raíz de una cardiopatía isquémica (infarto de miocardio) o debido a determinadas mutaciones genéticas (dilatación cardíaca idiopática). En las primeras fases la función cardíaca puede estar conservada, mientras que la transición a la cardiopatía dilatada provoca disfunción con una caída de la fracción de eyección. En la hipertrofia patológica se produce fibrosis, re-expresión de genes fetales y expresión de genes de estrés, además presenta una reversibilidad sólo parcial. Muchas rutas de señalización intracelular se han implicado en el desarrollo de esta situación patológica: la activación de la ruta de MAP quinasas, el eje CN/NFAT, la activación de la quinasa PKC y otras relacionadas con la transducción de señales a través de receptores de proteínas G (Houser *et al.*, 2012, Hill and Olson, 2008, Molkentin, 2013, van Berlo *et al.*, 2013). En la tabla 1 se recogen las principales características de la hipertrofia fisiológica y patológica, diferenciando entre concéntrica y dilatada.

**Tabla 1: Diferencias entre hipertrofia fisiológica y patológica.**

Parámetro de estudio	Hipertrofia fisiológica	Hipertrofia patológica	
		Concéntrica	Dilatada
<b>Aumento de masa miocárdica</b>	Aumento del grosor de la pared y del volumen del ventrículo coordinados	Aumento del grosor sin aumento del volumen	Aumento del volumen con adelgazamiento de pared (dilatación cardíaca)
<b>Tamaño del cardiomiocito</b>	Crecimiento a la vez en longitud y grosor, adición de sarcómeros en serie	Crecimiento en grosor, adición de sarcómeros en paralelo	Crecimiento en longitud, adición de sarcómeros en serie
<b>Expresión de genes fetales y de estrés</b>	No	Sí	Sí
<b>Fibrosis</b>	No	Sí	Sí
<b>Función cardíaca</b>	Normal	Normal	Deprimida
<b>Reversibilidad</b>	Sí	Sólo en primeras fases, no ante estímulos crónicos	No
<b>Tipo de metabolismo</b>	Oxidativo	Glucolítico	Glucolítico
<b>Cambios de expresión de genes que manejan el Ca<sup>2+</sup> intracelular</b>	No	Sí	Sí
<b>Mediadores moleculares</b>	Receptores tirosina quinasa, PI3K, AKT.	Proteínas G, receptores $\alpha/\beta$ -adrenérgicos, MAPK, CN/NFAT, PKA, CaMKII.	Proteínas G, receptores $\alpha/\beta$ -adrenérgicos, estrés oxidativo y apoptosis, CaMKII, eje PLN-Serca2

### *La ruta de señalización CN/NFAT en hipertrofia cardíaca*

La activación de la ruta CN/NFAT es dependiente, como hemos visto en apartados anteriores, de los niveles intracelulares de Ca<sup>2+</sup>. La función tejido cardíaco, por su parte, está condicionada por constantes corrientes de Ca<sup>2+</sup>, que son imprescindibles para la contracción y relajación fibrilar. Por lo tanto, existe una controversia sobre cómo se produce la regulación de la actividad de CN en este tejido (Molkentin, 2006). Existen dos hipótesis para explicar este hecho. La primera establece que el propio calcio “contráctil” controla directamente la señalización de CN en los cardiomiocitos mediante estímulos que aumentan la frecuencia y amplitud de estos flujos (Xia et al., 2000, Tavi et al., 2004, Dolmetsch et al., 1997, Colella et al., 2008). En cambio, la segunda hipótesis refiere a la existencia de microdominios en los cardiomiocitos donde la CN está asociada a canales de calcio no implicados en aportar Ca<sup>2+</sup> para la contracción muscular, sino exclusivamente para los procesos de señalización intracelular, por lo que existirían dos flujos de Ca<sup>2+</sup>, uno para la contracción-relajación y otro para la señalización. Este escenario ha ido ganando mayor credibilidad ya que se ha visto que la CN se encuentra asociada a las líneas Z de los cardiomiocitos (Heineke et al., 2005) y en

balsas lipídicas de la membrana plasmática (Makarewich et al., 2012), zonas diferentes a la afectada por los túbulos T que controlan los flujos de calcio contráctil (Heineke and Ritter, 2012, Houser and Molkentin, 2008, Wu et al., 2006, Molkentin, 2006, Gomez et al., 2013).

Durante los años 90 se describió que estímulos como angiotensina II (AngII) (Sadoshima et al., 1993), endotelina 1 (Shubeita et al., 1990) y agonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Simpson, 1983) inducían un fenotipo hipertrófico en cardiomiocitos en cultivo. Todos estos estímulos son capaces de aumentar las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tras la unión a sus receptores en la célula. Dado que en células linfoides estaba demostrado que el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular activaba CN, en 1998 Molkentin *et al* se plantearon analizar si la CN podía estar implicada en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Así, describieron que ratones transgénicos que sobreexpresaban CnA constitutivamente activa en los cardiomiocitos presentaban un corazón de tamaño significativamente mayor que los ratones no transgénicos, con cardiomiocitos claramente hipertrofiados. Al aumentar su edad, la hipertrofia daba paso a dilatación cardíaca y muerte por insuficiencia cardíaca. El tratamiento de estos ratones con CsA previno la aparición de hipertrofia, sugiriendo así el papel central de la CN en el desarrollo de la patología. Recientemente, se ha descrito la reversibilidad de la hipertrofia cardíaca dependiente de CN en un modelo animal donde la sobreexpresión de CnA constitutivamente activa en corazón es controlada por el tratamiento con doxiciclina de los ratones, lo que permite encender y apagar dicha sobreexpresión (Berry et al., 2011). Además, Molkentin *et al* también generaron ratones transgénicos que expresaban de forma cardiospecífica una forma constitutivamente nuclear de NFATc4. Estos animales presentaban también una destacada hipertrofia del corazón, lo que demostraba que la activación de la ruta CN/NFAT era capaz de inducir el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica (Molkentin et al., 1998).

A partir de este estudio, se publicaron numerosos trabajos que intentaron elucidar el papel de la ruta CN/NFAT en la patología, usando los inhibidores farmacológicos de CN, CsA y FK506 (Bueno et al., 2002a), o empleando diversos ratones manipulados genéticamente (Wilkins and Molkentin, 2004). En el caso del uso de dichos fármacos inmunosupresores, se encontraron resultados contradictorios, ya que en algunos estudios CsA o FK506 era capaz de inhibir la hipertrofia cardíaca producida en modelos transgénicos o quirúrgicos como constricción aórtica o renal (Hill et al., 2000, Sussman et al., 1998, Murat et al., 2000, Sakata et al., 2000), mientras que en otros no se apreciaba este efecto inhibitor o se trataba de una reducción parcial (Lim et al., 2000, Ding et al., 1999, Zhang et al., 1999). En el caso del uso de animales transgénicos, ratones *knock-out* para la isoforma  $\beta$  de la subunidad catalítica CnA

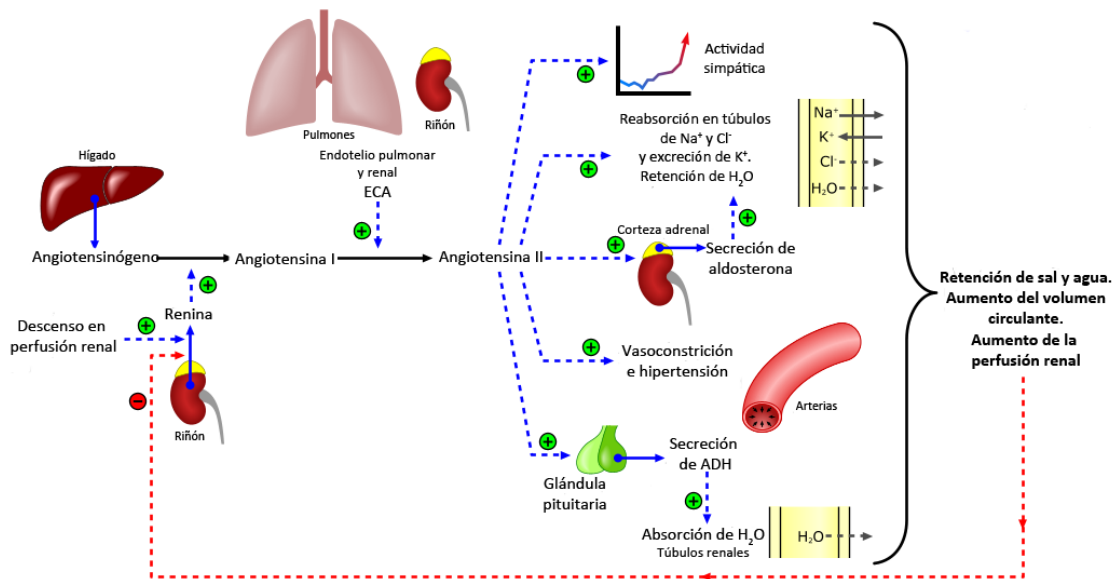
mostraron resistencia a los estímulos hipertróficos del isoproterenol (Iso) o la AngII (Bueno et al., 2002b), y la generación de ratones *knock-out* para NFATc2, NFATc3 y NFATc4 demostraron que la activación de CN necesita de NFAT como efector para generar el aumento de tamaño del corazón (Wilkins et al., 2002, Bourajjaj et al., 2008). En ratones transgénicos NFAT-Luc, donde la expresión transcripcional del marcador luciferasa está dirigida por sitios de unión para NFAT, se demostró que mientras la inducción de hipertrofia fisiológica no está mediada por la activación de la ruta CN/NFAT, la hipertrofia producida por constricción aortica o tras un infarto de miocardio activa esta ruta. En el caso del inhibidor endógeno RCAN1, en ratones transgénicos para esta proteína se inhibía la hipertrofia cardíaca frente a varios estímulos patológicos (Rothermel et al., 2001), lo que sugería un papel inhibitor de RCAN1 en la ruta CN/NFAT. Sin embargo, ratones *knock-out* para RCAN1 presentan diferente fenotipo hipertrófico dependiendo del estímulo aplicado, demostrando un papel dual de RCAN1 en la patología (Vega et al., 2003, Sanna et al., 2006). Otro acercamiento usando inhibidores endógenos de la ruta es la sobreexpresión de AKAP79 y Cain, que inhiben a CN reduciendo la hipertrofia producida por AngII o fenilefrina *in vitro* (Taigen et al., 2000), y el uso de vectores adenovirales que expresan Cain para infectar el miocardio como posible terapia génica contra esta patología (De Windt et al., 2001).

En el estudio con ratones *knock-out* para CnA mencionado anteriormente (Bueno et al., 2002b) sólo se eliminó una de sus dos isoformas con lo cual la actividad CN podía estar aún presente. Una forma de inhibir genéticamente la CN por completo es delecionar el gen CnB, ya que en ausencia de la subunidad reguladora CnB la subunidad catalítica CnA se desestabiliza y degrada, (Klee et al., 1998, Parsons et al., 2004). Sin embargo, los ratones *knock-out* para CnB presentan letalidad embrionaria por graves defectos en el desarrollo vascular (Graef et al., 2001b), por lo que para evitar esto se han generado ratones en los que CnB se puede eliminar de forma específica de tejido usando el sistema Cre-LoxP (Orban et al., 1992, Neilson et al., 2004, Parsons et al., 2004). En el caso del corazón, se usaron dos promotores que se expresan en distintos en el desarrollo del ratón en el que ésta se puede producir: el promotor Nkx2.5 para el estado embrionario y el  $\alpha$ MHC para la etapa postnatal (Maillet et al., 2010). Los primeros ratones resultaron ser letales debido a alteraciones en la formación de trabéculas y septo de los ventrículos. Los ratones con delección de CnB cardíaca tras el nacimiento sufren en edad adulta de muerte súbita debido a fuertes arritmias que los autores relacionan con una reducción en la expresión de proteínas relacionadas con el transporte de calcio en los cardiomiocitos, desorganización de la estructura mitocondrial y reducción en el número de células cardíacas (Maillet et al., 2010).

A pesar de los numerosos estudios realizados, en ninguno de ellos se ha abordado de forma directa el estudio del papel de la CN en el desarrollo de hipertrofia cardíaca patológica durante el estado adulto, que es cuando esta patología se produce, y que es el objetivo central de nuestro trabajo.

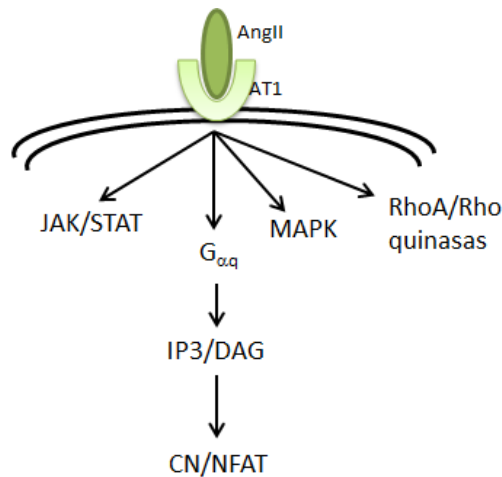
### ***La Angiotensina II y la ruta CN/NFAT en el corazón***

El sistema renina-angiotensina tiene una importancia crucial en la homeostasis del sistema circulatorio, siendo un regulador endocrino de la tonicidad de la vasculatura. Ante una caída de la presión arterial, pérdida de volumen sanguíneo o aumento de la osmolaridad del plasma, se activa la liberación de renina desde los riñones al plasma sanguíneo. La renina es la proteasa que corta el angiotensinógeno, que ha sido producido y liberado por el hígado, para dar el péptido angiotensina I (AngI), un decapeptido precursor de la AngII. AngI es transformada en AngII (octapeptido) por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), presente en las células endoteliales. AngII se une a sus receptores, AT1 y AT2, en las células vasculares de músculo liso (CVMLs), y activa una cascada de señalización que acaba provocando vasoconstricción, induciendo así un aumento de la presión arterial. Además, otros efectos de la activación de este sistema hormonal como reabsorción de agua y sales en el riñón, secreción de aldosterona y aumento de la actividad simpática, junto al aumento en la presión arterial, producen un aumento del volumen circulante, lo que revierte la situación inicial manteniendo la correcta perfusión de los órganos (Mehta and Griendling, 2007, Balakumar and Jagadeesh, 2014). Sin embargo, una activación constante de este sistema debida a diversas causas, como la existencia de patologías previas, la dieta o el estilo de vida, puede inducir una situación crónica de hipertensión, que puede a su vez derivar en la aparición de otras patologías, como el desarrollo de aneurismas abdominales aórticos (Daugherty et al., 2000), en aterosclerosis (Sata and Fukuda, 2010), aparición de fibrosis (Kato et al., 1991) y en la hipertrofia cardíaca (Rockman et al., 1994, Bruckschlegel et al., 1995). Además de la vasoconstricción, AngII tiene otras funciones en las CVMLs, regulando su proliferación y migración, eventos fundamentales en el remodelado vascular (Greene et al., 2001), y también funciona como una citoquina en la respuesta inflamatoria (Ruiz-Ortega et al., 2001).



**Figura 8: Esquema de funcionamiento del sistema renina-angiotensina. Adaptado de Aria Rad (2006) bajo licencia Creative Commons.**

AngII activa distintas cascadas de señalización tras su unión a los receptores de 7 dominios transmembrana, AT1 y AT2, tales como la rutas de activación mediadas por MAPKs; JAK/STATs; y RhoA/Rho quinasa (Touyz and Schiffrin, 2000, Mehta and Griendling, 2007). En respuestas patológicas el receptor AT1 es el principal transmisor de las señales de AngII mientras que la señalización a través de AT2 parece contrarrestar estas respuestas. El receptor AT1 está acoplado a proteínas  $G_{\alpha_q}$  triméricas, cuya activación provoca que fosfolipasa C (PLC) hidrolise fosfatidil inositol bisfosfato (PIP2) en inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). DAG va a activar la proteína quinasa C (PKC), mientras que IP3 va a unirse a su receptor en la membrana del retículo endoplásmico (IP3R), y como resultado, se produce la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo al citoplasma, lo que aumenta los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  (Touyz and Schiffrin, 2000, Mehta and Griendling, 2007). Por su parte, DAG además se une directamente a canales transitorios receptores de potencial (TRPCs) en la membrana plasmática, permitiendo la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular. Ambos eventos producirían la activación de CaM, y, como consecuencia, de la ruta CN/NFAT (Eder and Molkentin, 2011, Kuwahara et al., 2006, Gomez et al., 2013).



**Figura 9: Rutas de señalización activadas por AngII en cardiomiocitos.**

A pesar de que las CVMLs parecen ser las principales células efectoras de la AngII, ésta tiene receptores en casi todos los tipos celulares del cuerpo, siendo más estudiados su efecto en células del sistema cardiovascular, como endoteliales y cardiomiocitos. La presencia de receptores AT1 y AT2 en la membrana del cardiomiocito indica la existencia de una señalización directa de la hormona en este tipo celular. Estudios *in vitro* indican que AngII es capaz de activar la CN en cardiomiocitos en cultivo, provocando la translocación al núcleo de NFAT y una respuesta hipertrófica de los mismos, mientras que el uso de inhibidores de CN como CsA, Cain o RCAN1 revierten esta situación (Abbasi et al., 2005, Pedram et al., 2005, Rinne et al., 2010, Lunde et al., 2011, Molkenstein et al., 1998, Murat et al., 2000, Taigen et al., 2000). También existen estudios *in vivo* en los que se observa un efecto inhibitorio de la delección total de NFATc2/c3 (Wilkins et al., 2002, Bourajjaj et al., 2008) o de CnAβ (Bueno et al., 2002b) sobre el aumento del tamaño del corazón inducido por la infusión de AngII, o bien que muestran que CsA inhibe la hipertrofia cardíaca en animales transgénicos para angiotensinógeno (Mervaala et al., 2000) o con reducida perfusión renal (Murat et al., 2000). Sin embargo, solo existe un estudio en el que se describe que CsA inhibe el incremento del tamaño cardíaco inducido por la infusión de AngII (Goldspink et al., 2001). Todo esto sugiere la existencia de un acoplamiento entre la señalización por AngII y la ruta CN/NFAT en el miocardio.

La relación causa-efecto entre hipertensión e hipertrofia cardíaca ha sido casi dogmática desde hace años ya que en situaciones de alta presión arterial el corazón tiene que desarrollar un trabajo contráctil mayor para mantener el mismo volumen de eyección (Reudelhuber et al., 2007). Sin embargo, nuevos estudios apoyan la idea de que en situaciones patológicas AngII, aparte de ser un factor clave en el desarrollo de la hipertensión,

desencadena en el corazón una parte de la respuesta hipertrófica que es independiente de su efecto hipertensivo (Kurdi and Booz, 2011). Así, se ha descrito que ratones *knock-out* para SGK1 (Yang et al., 2012), tratados con estatinas (Yagi et al., 2008), CsA (Di Marco et al., 2011) o sometidos a restricción calórica (Finckenberg et al., 2012) presentan una respuesta hipertrófica reducida pese a que estos animales mantienen una elevada presión arterial. Además, existe una producción local de AngII en el corazón con efecto paracrino (Paul et al., 2006, Serner et al., 2001) y de hecho, en ratones transgénicos que sobreexpresan angiotensinógeno en los cardiomiocitos, y que por tanto tienen una producción local cardíaca de AngII, se produce un aumento del tamaño del corazón mientras que la presión arterial no aumenta (Mazzolai et al., 1998). Finalmente, en otro estudio, ratones con producción local cardíaca de AngII se trataron con acetato de deoxycorticosterona y sal, para producir hipertensión con una baja activación del sistema renina-angiotensina sistémico. En estos ratones con producción local de AngII, a pesar de presentar hipertensión arterial de forma similar a los controles, se desarrolla una hipertrofia cardíaca más exacerbada (Xu et al., 2010).

Dado que el  $\text{Ca}^{2+}$  es un importante segundo mensajero de la señalización celular, provocando la activación de factores de transcripción, podría existir una expresión génica inducida por el aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  tras la unión de AngII a los receptores AT1 y AT2 de la membrana celular del cardiomiocito. Algunos de los genes cuya expresión se ha visto alterada por AngII en el corazón son el péptido natriurético atrial (ANF), la proteína natriurética cerebral (BNP), los colágenos 1 y 3 (Kim and Iwao, 2000) y diversas metaloproteinasas de matriz (Brilla et al., 1995, Wang et al., 2009, Saygili et al., 2009). Una citoquina cuya expresión ha sido ampliamente relacionada con la AngII es el TGF $\beta$ , supuesto mediador de la fibrosis cardíaca producida por AngII (Lim and Zhu, 2006). Sin embargo, no se conoce en detalle si la expresión de estos genes en el corazón es directamente controlada por la activación de la ruta CN/NFAT, ni cuál es el perfil de expresión temprana mediado por ella, ya que aunque algunos trabajos han analizado el patrón de expresión génica en los diferentes modelos de la hipertrofia cardíaca, lo han hecho en una fase tardía de la enfermedad o no han analizado su dependencia de la ruta (Frank et al., 2008, Clerk et al., 2007, Larkin et al., 2004, Schwartz et al., 2004).



## OBJETIVOS



A pesar del conocimiento previo existente sobre la implicación de la ruta CN/NFAT como mediador de la hipertrofia cardiaca, aún se desconoce la contribución real de CN en el proceso patológico en adultos, su papel en fibrosis, su importancia en un modelo con hipertensión asociada o la relevancia de la ruta durante las fases tempranas de esta patología.

Nuestros objetivos durante este proyecto de tesis han sido:

1. Elucidar el papel de la CN en el curso del desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por AngII.
2. Caracterizar las fases tempranas de la enfermedad y determinar la contribución de CN en dichas fases.
3. Desarrollar vectores virales como herramientas terapéuticas de la hipertrofia cardiaca en modelos animales.



## MÉTODOS



## EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

### Animales

En los experimentos *in vivo*, se usaron ratones de dos genotipos distintos:

**1. Ratones silvestres:** Ratones de cepa c57Bl6/j, adquiridos según necesidad directamente al criador, el Área de Medicina Comparada del CNIC.

**2. Ratones transgénicos Myh6-CreEsr1 x Cnb1<sup>Δ/flox</sup>:** Ratones de cepa mixta, generados tras cruzar ratones Myh6-CreEsr1 y Cnb1<sup>Δ/flox</sup>. Estos últimos fueron obtenidos del laboratorio de Gerald Crabtree (Neilson et al., 2004), y presentan el gen de la Cnb1 con delección en un alelo (Δ) y el otro flanqueado por secuencias loxP (flox), siendo susceptible recombinación por la recombinasa Cre. Los ratones Myh6-CreEsr1 se adquirieron en Jackson Laboratories, y expresan la proteína Cre fusionada al receptor mutado de estrógenos ERT2 (Esr1) bajo el promotor cardio-específico de la cadena pesada de la alfa miosina (Myh6).

Estos ratones, por lo tanto, expresan específicamente en las células de músculo cardiaco la proteína recombinasa Cre, que al estar fusionada al receptor Esr1 se localizará en el citoplasma y, por tanto, estará inactiva. Si administramos un análogo de estrógenos como el tamoxifeno, este atravesará la membrana celular y se unirá a su receptor, provocando su translocación al núcleo. Así, la Cre puede ejercer su función recombinando secuencias flanqueadas por loxP, induciendo la delección del alelo de la Cnb1. Este sistema nos asegura una delección inducible y cardio-específica del gen Cnb1, necesaria para el estudio de nuestros objetivos.

Para genotipar los ratones de esta línea se usaron los siguientes cebadores en ensayos de PCR:

- Para el gen CreEsr1:

5'- AACCTGGATAGTGAAACAGGGGC -3'  
5'- TCCATGGAGCGCCAGACGAGACC -3'

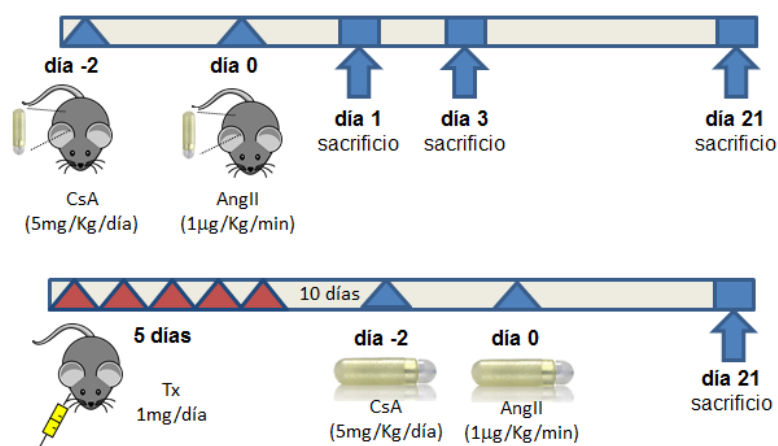
- Para el gen Cnb1<sup>Δ/flox</sup>:

5'- CCCTAGGCACTGTTCATGGT-3'  
5'- GCCACAGATTAGCCTCGTGT-3'  
5'- CACATTCACCCACAATTGC-3'

Los animales utilizados han sido criados y mantenidos en las instalaciones del CNIC en ambiente libre de patógenos (SPF), con control de temperatura, humedad y ciclos de luz/oscuridad según lo regulado por la normativa europea para cuidados animales (EU Directive 2010/63EU y Recommendation 2007/526/EC).

### **Modelo in vivo de hipertrofia cardiaca**

Se usaron machos de ambos genotipos entre 8-11 semanas en el momento de empezar el experimento. A los ratones de genotipo silvestre se les implantaron mini-bombas osmóticas con CsA y/o AngII, según el ensayo. Los ratones de genotipo Myh6-CreEsr1 x Cnb1<sup>Δ/flox</sup> fueron inyectados i.p. con 1 mg/día de 4-hidroxi-tamoxifeno (Tx, Sigma-Aldrich) vehiculado en aceite de maíz (Sigma-Aldrich) durante 5 días consecutivos, o con el vehículo solo en el caso de los animales control. Diez días después del fin de la administración, se les implantaron las mini-bombas osmóticas con el tratamiento correspondiente, CsA y/o AngII (Fig. 10).



**Figura 10: Modelo experimental de hipertrofia por infusión de AngII. En el panel superior, modelo seguido en los ratones de genotipo silvestre. En el inferior, modelo seguido en los ratones de genotipo Myh6-CreEsr1 x Cnb1<sup>Δ/flox</sup>.**

Dependiendo del ensayo se usaron mini-bombas de infusión para 7 días (mod. 2001, 1 µl/h, Alzet) o para 28 días (mod. 2004, 0,2 5µl/h, Alzet), que se rellenaron con los diferentes soluciones siguiendo las instrucciones del fabricante de tal forma que la infusión de AngII (Sigma-Aldrich) fue 1 µg/Kg/min mientras que en el caso de la CsA (Sadimmun, Novartis) fue 5 mg/Kg/día. La implantación de las mini-bombas se hizo de forma idéntica en ambos genotipos de animales. Los animales fueron anestesiados con anestesia inhalatoria (inducción al 3-5%, mantenimiento al 1-2% de sevofluorano) y, cuando estuvieron completamente sedados, se les practicó una incisión en la zona de la escápula. A continuación, se separó la piel



del músculo con suavidad para crear un espacio e introducir la mini-bomba, que queda implantada subcutáneamente. Por último, se suturó al animal usando sutura 4.0 o grapas para piel (Fine Science Tools), y una vez el animal se recuperó de la anestesia se le devolvió a su jaula. En experimentos preliminares de puesta a punto del protocolo se comprobó que animales con mini-bomba conteniendo suero salino (vehículo de AngII) y animales operados pero sin implantarles mini-bomba con suero salino se presentaban un comportamiento similar. Por tanto, en la mayoría de los experimentos los ratones del grupo control sufrieron la intervención quirúrgica descrita anteriormente aunque no se les implantó mini-bomba.

Una vez finalizado el tratamiento (a 1, 3 o 21 días post-implantación de mini-bomba con AngII), se procedió a la eutanasia de los animales, que se realizó por inhalación de CO<sub>2</sub> en una cámara cerrada. Los animales se pesaron sin mini-bomba, y se realizó la necropsia, extrayendo corazón, hígado, riñones, aorta y timo. Una parte de los órganos se congeló rápidamente en N<sub>2</sub> líquido para la extracción de proteína o ARNm y otra se guardó en formalina al 10% para su procesamiento en parafina. En el caso del corazón, las aurículas se descartaron y los ventrículos se pesaron. Después el ventrículo se seccionó transversalmente en tres partes, que se utilizaron para la obtención de proteína (zona apical), cortes histológicos (zona media) y ARNm (zona basal).

### *Terapia génica con virus*

Para los experimentos de terapia génica mediante la administración de virus se usaron machos c57Bl6/j de fenotipo silvestre de 8 semanas de edad. Los virus fueron descongelados y mantenidos en hielo, mientras a los ratones se les mantuvo a 37°C durante 10 minutos para permitir la vasodilatación por calor. Después los animales se inmovilizaron en una trampilla de metacrilato con la cola al descubierto, se localizó la vena caudal y se inyectó intravenosamente con una aguja de 25G la solución viral lentamente y de forma continua, siendo el máximo volumen inyectado de 250µl. Los animales permanecieron en estabulación durante 4 semanas post-inoculación para permitir la expresión del transgén, y dependiendo del ensayo, transcurrido este tiempo, se implantaron mini-bombas osmóticas con AngII para analizar los efectos del transgén.

En algunos experimentos se realizó la inyección intravenosa de los virus por vía intrayugular. Brevemente, se anestesiaron los ratones con una mezcla de ketamina y xilacina en suero salino (0,15 mg y 2 mg por gramo de peso del animal, respectivamente). Después se colocó al ratón en decúbito supino, inmovilizando las extremidades, y se le practicó una

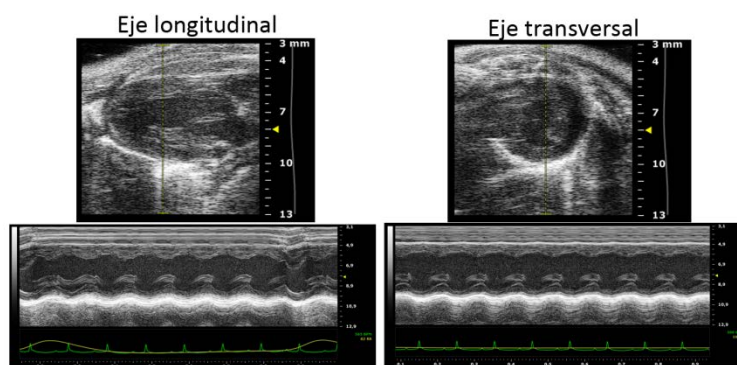
incisión en la zona de la clavícula. A través de este corte, se introdujeron pinzas para retirar los tejidos hasta llegar a la yugular. Manteniendo los tejidos separados, se inyectaron los virus (máximo 200µl) en el interior de la vena usando una jeringuilla para administración de insulina (aguja de 30G). Inmediatamente tras retirar la aguja, se presionó la zona con un bastoncillo para evitar la pérdida de sangre, y se cerró la incisión con pegamento para cirugía (3M). Tras su recuperación, el animal se devolvió a su jaula, y se esperaron 4 semanas para comprobar la expresión del transgén.

### ***Medida de presión arterial y ecocardiografía***

Durante el tratamiento hipertrófico, se realizaron dos procedimientos no invasivos para seguir la evolución temporal de la enfermedad:

**-Medición de la presión arterial:** El animal se ubicó en una de las trampillas del sistema de medición (BP-2000, Visitech Systems) a 39°C colocándole un manguito de presión en la cola. El sistema realiza 10 mediciones de prueba y 10 mediciones reales, que son monitorizadas y grabadas, obteniéndose los datos de presión arterial sistólica, diastólica y pulso por animal. Las mediciones se realizaron antes de la implantación de las mini-bombas (que denominamos día 0), y a día 1, 3, 7, 14 y 20 post-implantación de la mini-bomba de AngII.

**-Ecocardiografía:** El animal se anestesió con anestesia inhalatoria (1-2% isofluorano) y se le coloca en decúbito supino en un placa a 37°C donde se fijan sus extremidades a unos electrodos para monitorizar su pulso y su electrocardiograma. Usando una sonda MS-400 de 30MHz (VEVO2100, Visualsonics), se toman imágenes de ultrasonido de alta frecuencia en modo M y modo 2D de los ejes longitudinal y transversal del ventrículo izquierdo (Fig. 10). Tras la toma de imágenes, se deja al animal en su caja para su recuperación. Este procedimiento se realizó antes de la implantación de las mini-bombas (que denominamos día 0), y a día 1, 3 y 21 post-implantación de la mini-bomba de AngII.



**Figura 11:** Imágenes obtenidas por ecocardiografía del eje longitudinal y transversal del corazón, en modo 2D (panel superior) y M (inferior).

## GENERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE VECTORES VIRALES

A lo largo de este proyecto se usaron dos tipos de vectores virales. Para los primeros trabajos, se usaron vectores lentiviral (LV); después se optó por el uso de vectores adeno-asociados de serotipo 9 (AAV9), con afinidad por las células de músculo cardíaco.

### *Vectores lentivirales*

Para generar un vector lentiviral de expresión cardio-específica, primero se sustituyó el promotor viral SFFV (spleen focus-forming virus) del vector lentiviral pHRSIN-CSGW-dlNotI (cedido por Mary K. Collins, University College London, Reino Unido) por un fragmento de 700 pb del promotor de la cadena pesada de la miosina alfa ( $\alpha$ MHC), promotor que se expresa en células cardíacas específicamente. Una vez obtenido el nuevo esqueleto lentiviral cardio-específico, se clonó la secuencia inhibidora de CN, LxVP, y su versión mutada, mutLxVP, obteniendo las siguientes construcciones lentivirales:

1. MHC-GFP: expresando como transgén la proteína verde fluorescente, para comprobar la expresión del vector.
2. MHC-LxVP: expresando la proteína verde fluorescente fusionada al péptido inhibidor de CN LxVP, para ensayar la inhibición de la ruta CN/NFAT.
3. MHC-Mut: expresando la proteína verde fluorescente fusionada con una secuencia mutada de LxVP, que se usa como control en los ensayos de inhibición de la ruta.



**Figura 12: Mapas de los vectores lentivirales generados. 1: MHC-GFP; 2: MHC-LxVP; 3: MHC-Mut.**

Como control, se usaron los mismos vectores con el promotor viral SFFV, para comparar los niveles de expresión dirigidos por los dos promotores.

La producción de los LV se realizó mediante el método de transfección con fosfato cálcico en células Hek293T, en el que se mezcló el plásmido del LV con el plásmidos para la envuelta del lentivirus (PMD2.G) y el plásmido auxiliar 8.9. Dos y tres días después de la transfección, se realizaron sendas recogidas del sobrenadante celular, que se

ultracentrifugaron a 26000 rpm durante 2 horas. El pellet resultante se resuspendió en 200µl de PBS frío y se congeló a -80°C para su preservación.

La titulación del virus se realizó mediante infección de volúmenes seriados de solución viral en células T Jurkat, que se mantuvo durante 5 horas. Tras una incubación de 24 horas, las células se analizaron en el citómetro para comprobar el número de células infectadas. En el caso de virus de promotor cardio-específico se usaron células H9c2 para la titulación, ya que no se expresan en células no cardíacas. Se usó la siguiente fórmula para determinar el título del virus a partir del porcentaje de células infectadas:

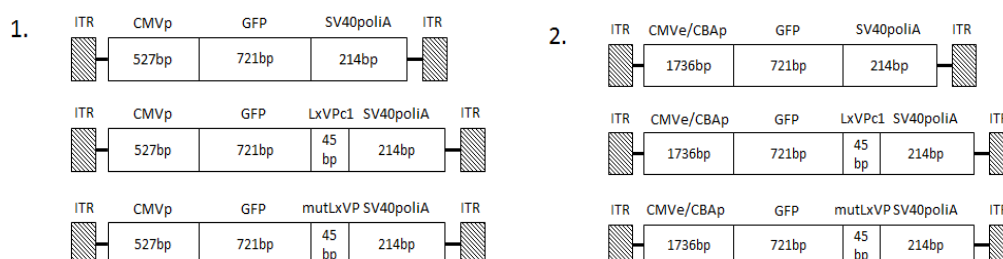
$$\frac{\% \text{ de células infectadas} \times \text{número de células totales}}{100} \times \text{factor de dilución del virus}$$

## Vectores adeno-asociados 9

Los AAV9 fueron cedidos por Roger J. Hajjar, y en ellos se clonaron las secuencias GFP-LxVP y GFP-mutLxVP, mencionadas en el apartado anterior.

Se han utilizado dos tipos de AAV9:

1. **pdsAAV-GFP, -LxVP y -Mut:** a partir de ahora, dsAAV-GFP/dsAAV-LxVP/dsAAV-Mut. Estos vectores incorporan ADN de cadena doble desde su producción, por lo que no necesitan replicarse antes de comenzar la transcripción, siendo por lo tanto más rápidos en transducir las células. En cambio, tienen una limitación de tamaño del transgén mucho mayor. La expresión del transgén es dirigida por el promotor del citomegalovirus (CMV).
2. **pTrek1-GFP, -LxVP y -Mut:** a partir de ahora, ssAAV-GFP/ssAAV-LxVP/ssAAV-Mut. Son vectores AAV9 de cadena simple, que necesitan, tras su entrada en la célula, replicarse para generar la segunda copia de su secuencia y tener un ADN de doble cadena apto para la expresión del transgén. La expresión del transgén es dirigida por el promotor de la actinina beta de pollo (CBA) con el activador del CMV.



**Figura 13: Mapas de los vectores adenoasociados generados. 1: Vectores de doble cadena dsAAV-GFP, dsAAV-LxVP y dsAAV-Mut, de arriba abajo. 2: Vectores de cadena simple ssAAV-GFP, ssAAV-LxVP y ssAAV-Mut, de arriba abajo.**

Para su producción se usó el método de transfección con PEI (polietiliminina) en células Hek293T. Brevemente, se transfectaron las células con el plásmido del vector junto con un plásmido (PDG9) que contiene los genes para la envuelta del AAV9 y los genes del adenovirus necesarios para la producción del adeno-asociado. Después de 3 días de incubación, se recogieron las células, de las que se obtuvo un lisado celular por congelación/descongelación, y el sobrenadante, del que se precipitaron los virus existentes en el medio con sulfato de amonio. Los virus de ambas preparaciones se purificaron por ultracentrifugación en un gradiente de densidad de iodixanol (Optiprep, Sigma) a 69000 rpm durante una hora. Después, se extrajo por punción la banda en la que se encuentran los virus (entre el 40 y 50% de concentración de iodixanol). Este extracto contenía los virus purificados en un medio de alta densidad, por lo que se optó por su diálisis en concentradores (Vivaspin 20, 100kDa) para diluirlos en suero lactato de Ringer, y después se congelaron a -80°C para su preservación.

La titulación de los AAV9 se realizó por qPCR de la preparación final de virus usando como cebadores unas secuencias específicas para la cola de poliadenilación del SV40, secuencia que llevan ambos AAV9 tras el transgén, y usando una curva patrón realizada con diluciones seriadas de un virus de título conocido. El título del virus, expresado en número de genomas virales presentes en la solución final (vg: *viral genomes*), se calcula a partir de la ecuación de la recta obtenida tras la representación de las Cq de los puntos de la curva patrón frente al logaritmo natural de la cantidad de ADN presente en cada punto de la misma.

## EXPERIMENTOS IN VITRO

### *Cultivos celulares*

Dada la naturaleza de los AAV9, que infectan de forma específica los cardiomiocitos y que necesitan largo tiempo para expresarse en las células (entre 2 y 3 semanas), y la dificultad de mantener dichas células en cultivo tanto tiempo, sólo se realizaron ensayos de infección *in vitro* con los LV. Los ensayos *in vitro* de los AAV9 se realizaron transfectando el plásmido en las células, no usando las partículas virales.

Para comprobar la eficiencia de transducción de las distintas construcciones LV y la capacidad inhibidora del transgen LxVP expresado en ambos tipos virales se infectaron o transfectaron con dichos vectores distintos tipos celulares:

- **HEK293T** (*Human Embryonic Kidney 293T*): línea celular de origen renal que se mantuvo en cultivo con medio DMEM (Sigma) suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS) (Sigma) y 100U/ml de penicilina-estreptomicina y glutamina.

- **H9c2**: línea celular inmortalizada a partir de mioblastos de rata, por lo tanto de origen cardíaco. Se mantuvieron igual que las anteriores.

- **MLEC** (*Mouse Lung Endothelial Cells*): línea celular inmortalizada de origen endotelial. Se mantuvieron igual que las anteriores.

- **Células T Jurkat**: línea celular de origen linfocitario. Se mantuvieron en RPMI con antibióticos y 10% FBS.

- **CMLV** (Células de Músculo Liso Vascular): cultivo primario de células de la capa media de la aorta. Se obtuvieron extrayendo a partir de aortas de ratón de fenotipo silvestre, que se limpiaron con ayuda de fórceps, eliminando la grasa y la adventicia que las cubre. Después, las aortas se cortaron en secciones y se incubaron a 37°C 30 minutos en una placa con 2 ml de medio DMEM con antibióticos y glutamina pero sin suero, añadiendo 0,04% de colagenasa tipo II (Sigma-Aldrich). La digestión se paró con DMEM con antibióticos y 20% FBS sin descomplementar (Euroclone), y se centrifugaron a 900rpm durante 4 minutos. El pellet resultante, compuesto por explantes de la aorta, se disgregó despacio y se resuspendió en DMEM con antibióticos y 20% FBS sin descomplementar, y se sembró en una placa, que se mantuvo en el incubador durante 5 días, cambiando el medio usado por fresco cada 2 días. Al sexto día, las células habían salido de los explantes, y se sembraron normalmente en DMEM con antibióticos y glutamina y 20% suero, manteniéndose hasta pase 14 o 15.

- **Cardiomiocitos de ratón adulto**: cultivo primario de células de músculo cardíaco. Ratones macho c57Bl6/j de fenotipo silvestre de 8 semanas de edad fueron sacrificados mediante dislocación cervical. Se abrió el pecho del animal hasta descubrir el corazón y se extrajo con cuidado. Con ayuda de una lupa, se canuló la aorta con una cánula de 25G, y se ataron con una sutura de 4/0 para mantenerlas juntas. Después se colocó el corazón en un sistema de perfusión compuesto por un circuito con una bomba de perfusión y un serpentín refrigerante conectado a un baño de agua a 37°C. Inmediatamente, se empezó a bombear a través del circuito con buffer de perfusión con el flujo a 3 ml/min durante 4 min. Después, se vació el circuito y se llenó con el buffer de digestión con colagenasa durante 10 min, hasta que el corazón tuvo un color pálido, señal de que se ha degradado el tejido conectivo. Se sacó la cánula y separaron las aurículas y la aorta, colocando los ventrículos en una placa de 60 con

2,5 ml del buffer de digestión. Las fibras se separaron poco a poco con las pinzas, y con una pipeta Pasteur de plástico se pipeteó despacio unas cuantas veces hasta que el tejido se desintegró lo más posible. La suspensión celular se transfirió a un tubo de 15 ml, y se añadió 2,5 ml de buffer sin collagenasa ni calcio para parar la digestión, y se siguió disociando el tejido por pipeteo durante un máximo de 5 min. Se centrifugó 1 minuto a 180 xg, y se resuspendió el nuevo pellet en 5 ml de buffer sin calcio. Después, se transfirió a una placa de p60, donde se procedió a reintroducir el calcio en las células cardíacas por adición de cantidades crecientes de  $\text{CaCl}_2$ . Después se transfirió la mezcla a un tubo nuevo y se centrifugó 1 min a 180 xg, tras lo cual se resuspendió el pellet con 5 ml de medio de plaqueo, que contiene 10% de FBS, a 37°C. Se tomó una pequeña muestra para contar los miocitos vivos (con forma de bastón) que teníamos en la muestra usando una cámara de Neubauer, siendo la cantidad óptima entre 500.000 y 800.000 células y un 80% de supervivencia al proceso. Se ajustó la concentración de células a 25.000 células/ml en medio de plaqueo y se añadieron a una placa tratada previamente durante 4 horas con laminina (0.87 mg/ml, Sigma-Aldrich). Después de 2 horas, se retiró el medio de plaqueo por aspiración y se añadió medio de cultivo, que contiene BSA en lugar de suero fetal bovino. En estas condiciones de aislamiento, las células se mantuvieron en cultivo un máximo de 3 días, tras lo cual entran en apoptosis espontáneamente. Los medios usados se prepararon según lo dispuesto en el protocolo de AfCS número PP00000125, disponible en Internet.

### ***Ensayos de expresión de la proteína GFP***

Se plaquearon 20.000 células H9c2, VSMC y MLEC en pocillos de 35mm y se infectaron con LV  $\alpha$ MHC-eGFP y SFFV-eGFP a una MOI=48 (MOI: multiplicidad de infección, es decir, número de partículas virales por célula). Tras 12 horas, se cambió el medio para parar la infección y se dejaron las células en el incubador a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  durante 5 días. Después de este tiempo, se adquirieron fotos de cada cultivo celular en un microscopio de fluorescencia a 20x (Nikon) y se analizaron las células por citometría de flujo (FACS-Diva, Becton Dickinson) para determinar la expresión de GFP en los tres tipos celulares.

### ***Ensayos in vitro de inhibición de la ruta CN/NFAT: western blotting y ensayos reporteros de luciferasa.***

Para los LV, se infectaron células H9c2 (MOI=48) con los LV MHC-GFP, -LxVP o -Mut y SFFV-GFP, durante 12 horas. Tras 5 días de incubación a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ , se les retiró el medio y se les añadió medio fresco sin FBS. Tras 24 horas de incubación sin suero, las células se

estimularon con 1  $\mu$ M de ionóforo de calcio (Io) (A23187, Calbiochem) y 0,3 mM  $\text{Ca}_2\text{Cl}$  durante 30 minutos, y con o sin CsA (200 ng/ml). Después, se retiró el medio y las células se lisaron con buffer de lisis total (20 mM Tris-HCl pH7,5, 1% Tritón X-100, 50 mM fluoruro sódico, 5 mM cloruro magnésico, 500 mM NaCl y 10 mM EDTA, con inhibidores de proteasas benzamidina 100 $\mu$ M, 1  $\mu$ g/ml leupeptina, 1  $\mu$ g/ml pepstatina, 1  $\mu$ g/ml aprotinina y 1  $\mu$ M ditioneol, 1 mM PSMF y 3 mM EGTA) durante 30 min en agitación a 4°C para extraer las proteínas. A continuación, los extractos se centrifugaron durante 15 min a 16.000 xg y a 4°C, y recogimos el sobrenadante que contiene las proteínas solubles. La concentración de proteína se determinó mediante un ensayo colorimétrico Bradford (BioRad) por interpolación a partir de una curva de concentraciones conocidas de albumina de suero bovino. Para detectar el estado de fosforilación de proteínas NFAT por *western blotting*, 30  $\mu$ g de extracto proteico se mezclaron con tampón de carga Laemmli 5x en condiciones reductoras y se desnaturalizaron durante 5 min a 99°C. Se hicieron geles de poliacrilamida para SDS-PAGE al 6% de concentración, y se cargaron en los pocillos. Se aplicó un campo eléctrico de 120V al gel hasta que el frente de carga llegó al final del gel. Después, se extrajo el gel y se puso en contacto con una membrana de nitrocelulosa, y se aplicó una corriente de 350mA durante 35 minutos para la transferencia de las proteínas separadas a la membrana. A continuación, la membrana se bloqueó con PBS con 5% de leche en polvo durante una hora a temperatura ambiente, y a continuación se incubó con el anticuerpo anti-NFATc4 (Santa Cruz Biotechnologies, 1:1000) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, y tras lavar la membrana 3 veces con TBS-T, se incubó la membrana con un anti-suero de conejo conjugado con peroxidasa HRP a una concentración de 1:5000 en TBS-T durante una hora a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar la membrana con TBS-T y se revelan usando el kit de ECL (Enhanced Chemoluminescence) de Amersham.

Para los AAV9, células HEK293T se transfectaron con el plásmido dsAAV-LxVP o -Mut o -GFP junto con un plásmido de expresión para NFATc2 (pEFBOSHA-NFATc2), usando el método de fosfato cálcico. Después de 48 horas, se incubaron durante 24h con medio fresco sin FBS y tras este tiempo las células se estimularon y se lisaron siguiendo el mismo protocolo explicado en el párrafo anterior. Las muestras se analizaron por *western blotting* siguiendo el protocolo descrito arriba y las membranas se hibridaron con el antisuero de conejo anti-NFATc2 672 (no comercial) para detectar el estado de fosforilación de la proteína transfectada NFATc2, y con el antisuero de conejo anti-GFP (no comercial) para comprobar la transfección por el plásmido.

La actividad transcripcional mediada por NFAT se ensayó en células HEK293T transfectadas con el plásmido dsAAV-LxVP o -Mut o -GFP junto con un plásmido reportero de



luciferasa cuya expresión está dirigida por el promotor de la interleucina 2 (IL2-Luc), que contiene sitios de reconocimiento para NFAT. Después de 48 horas, las células se incubaron durante 24h con medio fresco sin FBS, y transcurrido este tiempo las células se estimularon con 10 ng/ml de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma) en combinación con 1  $\mu$ M I $\alpha$  y 0,3 mM Ca<sub>2</sub>Cl durante 5 horas. Después, las células se lisaron con buffer de lisis y se añadió 100 $\mu$ l de luciferina por muestra (kit para ensayos luciferasa, Promega), midiendo las unidades relativas de luminiscencia (RLU) en un luminómetro (Berthold).

## **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TISULARES Y WESTERN BLOTTING**

### ***Extracción de proteína total de tejidos***

Las muestras de tejido de ratón obtenidas y congeladas a -80°C se pulverizaron con un mortero de metal. El polvo resultante se resuspendió en 500  $\mu$ l del buffer de lisis total detallado en el apartado anterior y se disgregó usando el equipo MagnaLyser (Roche) a 6.500 rpm durante 60 segundos. A continuación, las muestras se incubaron durante 1 h en agitación a 4°C, y después se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante, que contiene el extracto proteico hidrosoluble, se recogió y guardó a -80°C.

### ***Western blotting***

Se cuantificó la concentración de proteína de las muestras usando el método de Bradford en un espectrofotómetro, usando concentraciones conocidas de BSA como curva patrón. Se hicieron geles de poliacrilamida para SDS-PAGE de concentraciones diferentes dependiendo del tamaño esperado de la proteína a analizar, y 50  $\mu$ g de los extractos se cargaron en los pocillos en condiciones reductoras.

Los anticuerpos utilizados son: anti-RCAN1 (Sigma-Aldrich, 1:1000), anti-Cox2 (Cayman, 1:1000), anti-CnB (Upstate, 1:2000), anti-CnA (Chemicon, 1:1000), anti-tubulina (Sigma-Aldrich, 1:40000), anti-PSF (Sigma-Aldrich, 1:1000), anti-actinina sarcomérica (Sigma-Aldrich, 1:1000) y anti-suero de conejo anti-GFP (no comercial, cedido por José Ignacio Rodríguez Crespo, Universidad Complutense de Madrid, 1:1000).

## **EXTRACCIÓN DE RNA Y PCR CUANTITATIVA**

Las muestras de tejido para obtención de RNA se disgregaron en 1ml de Trizol (Tripure, Roche) usando el equipo MagnaLyser (Roche) a 6.500 rpm durante 60 segundos. Después, se

mezclaron por agitación con 200µl de cloroformo y se centrifugaron a 12.000 xg durante 15 min a 4°C, formándose dos capas, una superior acuosa y transparente, que se extrajo por pipeteo, y una inferior hidrofóbica y coloreada que se desechó. Añadimos 500µl de isopropanol a la capa acuosa, mezclamos por inversión y dejamos precipitar los ácidos nucleicos durante la noche a -20°C. Al día siguiente, centrifugamos a 12.000 xg durante 15 min, obteniendo un precipitado de ácidos nucleicos que se lavó con 500 µl de etanol 70% frío, y se centrifugó a 7.500 xg durante 5 min. El precipitado resultante se resuspendió en 20 µl de agua desionizada y libre de nucleasas. Después la concentración de ARN se cuantifico usando el equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

El ARN obtenido se transformó en ADN complementario (ADNc) mediante la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen) durante 50 min a 37°C. Los niveles de los diferentes transcritos se analizaron por PCR cuantitativa usando el sistema de cuantificación de expresión génica *SYBR Green* (Promega) o *Taqman* (Applied Biosystems), dependiendo de los genes a analizar, y en cada reacción se utilizaron 50 ng de ADNc junto con las secuencias cebadoras específicas (SYBER Green) o sonda específica (Taqman). Las sondas usadas fueron las, siguientes:

**Tabla 2: Relación de secuencias usadas con el sistema *Sybr Green***

Secuencias específicas usadas		
Gen	Dirección de la sonda	Secuencia
GFP	forward	CCTGAGCAAAGACCCCAAC
	reverse	CTTGTACAGCTCGTCCATGC
M36b4	forward	GCGACCTGGAAGTCCAATA
	reverse	ATCTGCTGCATCTGCTTGG
Col1a1	forward	GCTCCTCTAGGGGCCACT
	reverse	CCACGTCTCACCATTGGGG
Col3a1	forward	CTGTAACATGGAACTGGGGAAA
	reverse	CCATAGCTGAACTGAAAACCACC
GAPDH	forward	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	reverse	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
CTGF	forward	GTGCCAGAACGCACACTG
	reverse	CCCCGGTTACTACTCCAAA
TGFβ1	forward	CGCCATCTATGAGAAAACC
	reverse	GTAACGCCAGGAATTGT

Tabla 3: Relación de sondas *Taqman* usadas

Sondas Taqman	
Nombre	Código
RCAN1.4	Mm00627762_m1
Cox-2	Mm00478374_m1
HPRT1	Mm00446968_m1
Nppb	Mm00435304_g1

## PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS

Tras su extracción, los tejidos de ratón se dejaron en formalina 10% durante la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron con PBS y se dispusieron en casetes de histología sumergidos en etanol 70%. Tras su paso por el procesador, en el que el tejido se deshidrató por inmersión en alcoholes de graduación creciente y se embebió en parafina, los tejidos se incluyeron en bloques de parafina. Los cortes de los tejidos (5 µm de espesor) se realizaron con un micrótopo manual (Leica) sobre portaobjetos cubiertos con polilisina, y luego se usaron para distintos análisis.

### *Detección de fibrosis mediante tinción con Picrosirius Red (PSR)*

Después de desparafinar los cortes de tejido en xilol e hidratarlos en alcoholes de graduación decreciente hasta terminar en agua, los cortes fueron incubados durante una hora a temperatura ambiente con la solución de Picrosirius Red (0,5 g de Direct Red 80 en 500ml de ácido pícrico (Sigma-Aldrich). A continuación, las muestras se lavaron 4 veces con 0,5% de ácido acético en agua hasta que dejaron de desteñir. Por último, los cortes se lavaron 3 veces en etanol absoluto y se incubaron 10 min en xilol, para finalmente montar los cubreobjetos con medio de montaje DPX (Panreac). Finalmente, las secciones teñidas se escanearon mediante un escáner de alta resolución para muestras de histología (Nanozoomer, Hamamatsu), obteniendo imágenes completas de la sección cardiaca. La tinción de Picrosirius Red detecta fibras de colágeno que se tiñen de color rojo. La cuantificación del porcentaje de área total teñida en rojo (área de fibrosis) se realizó con el software de análisis de imagen ImageJ.

### *Análisis del área celular mediante tinción con lectina fluoresceinada*

Las muestras se desparafinaron e hidrataron, y posteriormente se trataron durante 3 min con buffer citrato (10 mM citrato de sodio, 0,05% Tween-20, pH 6) en un autoclave

(125°C). Tras enfriar las muestras en hielo, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con 100 µg/ml de lectina de *Triticum vulgaris* conjugada con FITC (Sigma-Aldrich) en PBS durante la noche a 4°C y en oscuridad. Esta lectina se une a los carbohidratos de la superficie celular delimitando el área de los cardiomiocitos en las secciones transversales del corazón. Al día siguiente, las muestras se lavaron 5 veces con PBS y una última vez en agua, y se montaron los cubreobjetos con Mowiol-Dabco (Calbiochem). Tras dejar secar en oscuridad durante la noche, se tomaron fotografías en el microscopio de fluorescencia, usando el objetivo de 10x (Nikon). Las imágenes capturadas (4 imágenes/corazón) sirvieron para cuantificar el área de los cardiomiocitos usando el software de análisis de imagen ImageJ.

### ***Detección de proteína GFP mediante inmunohistoquímica***

Para analizar la expresión de GFP en secciones de corazón mediante inmunohistoquímica, tras desparafinar las muestras, el antígeno se desenmascaró durante 3 min con buffer citrato a 125°C. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5 min y los antígenos no específicos se bloquearon usando PBS suplementado con 1% FBS durante 20 min. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFP (Acris Antibodies R1091P, 1:500) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra generado en conejo (Dako), y seguidamente para amplificar la señal, con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa HRP (Dako). La actividad enzimática peroxidasa se reveló incubando las muestras con el sustrato diaminobenzidina (DAB) y se contratiñeron los núcleos con hematoxilina. Finalmente, las secciones teñidas se escanearon usando un escáner de alta resolución para muestras de histología.

En el caso de secciones de aorta, tras desparafinar las muestras, se procedió a bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 min y los antígenos no específicos se bloquearon usando PBS suplementado con 1% de BSA y 5% suero de caballo durante 30 min. A continuación, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario anti-GFP (Invitrogen A11122, 1:100) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo biotinilado generado en cabra (Jackson), y seguidamente con el reactivo ABC (Dako). La actividad enzimática peroxidasa se reveló incubando las muestras con el sustrato diaminobenzidina (DAB) y se contratiñeron los núcleos con hematoxilina. Finalmente, las secciones teñidas se fotografiaron en un microscopio Leica a una magnificación de 20x.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos representados se corresponden con la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Los experimentos fueron analizados usando el programa de análisis estadístico, GraphPad Prism 5. Excepto donde se señale, se realizó un análisis de la varianza con un factor (*one-way* ANOVA) seguido de un post-test de Newman-Keuls para calcular la significación de las diferencias encontradas entre grupos experimentales. El número de muestras usadas en cada grupo está indicado en cada figura.



## RESULTADOS





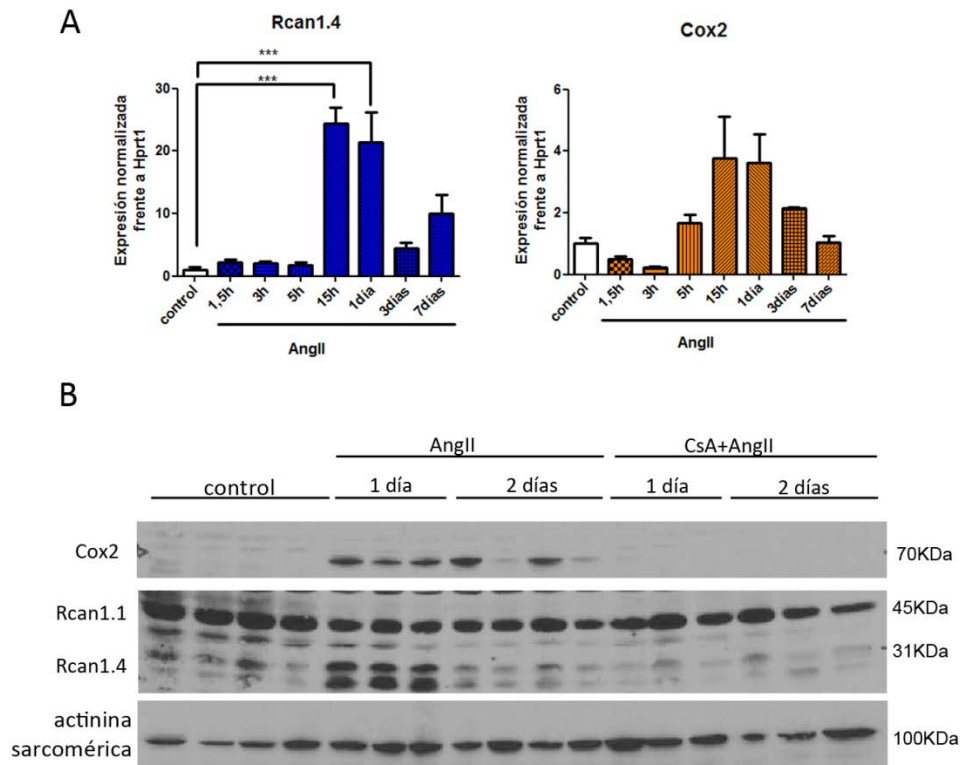
## ESTUDIO DE LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN CN/NFAT EN EL DESARROLLO DE HIPERTROFIA CARDIACA

Para abordar el estudio del papel de la ruta de señalización CN/NFAT en hipertrofia cardiaca hemos usado como modelo *in vivo* la infusión de AngII en ratones adultos. Este modelo, que consiste en la implantación subcutánea de mini-bombas osmóticas conteniendo AngII, induce hipertrofia ventricular izquierda entre 14-28 días de tratamiento y cursa con hipertensión (Freund et al., 2005, Sundaresan et al., 2009).

### *La ruta CN/NFAT es activada en el corazón por AngII*

Para determinar si la ruta de CN/NFAT se activaba en el tejido cardiaco durante las fases iniciales de la hipertrofia cardiaca inducida por AngII, tratamos ratones silvestres con AngII durante diferentes tiempos. El análisis de la expresión de genes conocidos cuya expresión depende de CN, *Rcan1* y *Cox2*, mostró que AngII inducía su expresión de forma temprana. Los niveles máximos de ARNm de ambos genes analizados por qPCR se alcanzaban tras 15 h de tratamiento con AngII. La expresión se mantuvo alta a las 24 h de tratamiento, y a partir del tercer día de infusión con AngII los niveles de ARNm comienzan a descender (Fig. 14A).

Los resultados obtenidos a nivel de ARNm fueron confirmados en ensayos de *western blotting*. En extractos citosólicos de proteínas obtenidos de corazón, observamos que la expresión de proteína Rcan1.4 claramente se inducía tras 24 h de tratamiento con AngII, volviendo a su nivel basal de expresión después de dos días de tratamiento. Los niveles proteicos de Cox2 también se incrementaron después de 24h de infusión con AngII, aunque en este caso el incremento se mantuvo durante dos días de tratamiento (Fig. 14B). En estos experimentos, con el fin de determinar la posible implicación de CN en la inducción de estas proteínas mediada por AngII, incluimos un grupo de ratones a los cuales les inyectamos i.p. el inhibidor de CN, CsA, durante el tiempo que duro el tratamiento con AngII. CsA previno la inducción de las proteínas Rcan1.4 o Cox2 en el tejido cardiaco de estos ratones en respuesta a AngII (Fig. 14B). El conjunto de estos resultados sugería que en nuestro modelo *in vivo* de hipertrofia, la AngII era capaz de activar la ruta de señalización CN/NFAT en el corazón.



**Figura 14: AngII induce la activación de la ruta CN/NFAT. A:** Cinética de expresión de ARNm de los genes diana de la ruta, Rcan1.4 y Cox2, en corazones estimulados con AngII (1  $\mu$ g/Kg/día) durante los tiempos indicados. **B:** Western blot de Cox2 y Rcan1 en extractos de corazón de ratones sin tratar (control), tratados durante 1 y 2 días con AngII (AngII), o co-tratados con CsA (20 mg/Kg/día) y AngII (CsA+AngII). \*\*\*  $p < 0,001$

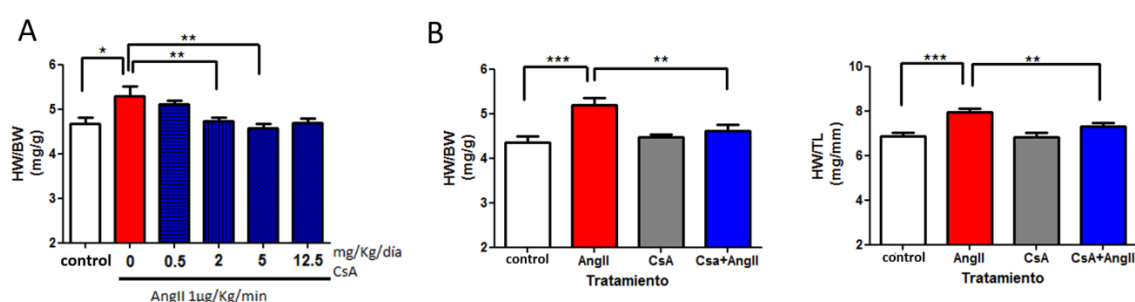
### *La inducción de hipertrofia cardíaca mediada por AngII es dependiente de CN*

Para analizar cuál era la contribución de la activación de la ruta CN/NFAT en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca inducida por AngII, usamos dos aproximaciones experimentales: una farmacológica, utilizando el fármaco inhibidor de CN, CsA, y otra genética, por medio de la generación y uso de ratones transgénicos *knock-out* inducibles y cardioespecíficos para CnB. En ambos abordajes experimentales analizamos diversos parámetros para diagnosticar la hipertrofia cardíaca patológica: el incremento del peso ventricular frente al peso del cuerpo (HW/BW) o la longitud de la tibia (HW/TL), el aumento de tamaño de los cardiomiocitos, el incremento de grosor de las paredes del septo y posterior del ventrículo izquierdo y la inducción de fibrosis en el miocardio.

### *El tratamiento con CsA previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca inducida por AngII*

Dada la controversia sobre los efectos CsA en otros modelos de hipertrofia cardíaca patológica, postulamos que la variabilidad en las dosis y el modo de administración de la CsA empleados podrían causar las discrepancias observadas. Realizamos experimentos de dosis-

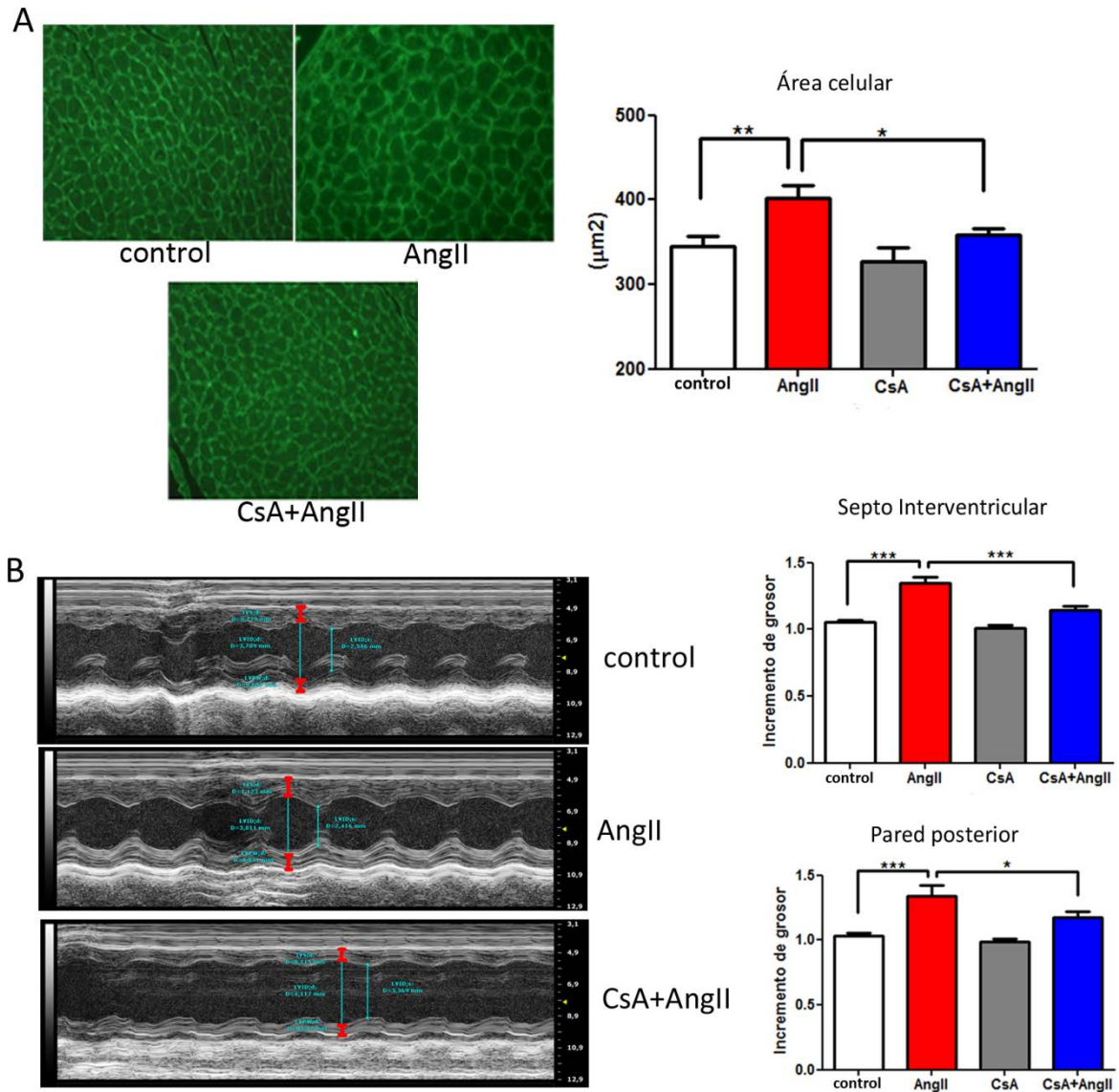
respuesta de CsA en nuestro modelo de infusión de AngII. Ratones silvestres tratados con AngII durante 21 días fueron comparados con ratones a los que se le había implantado una mini-bomba osmótica adicional infundiendo distintas dosis de CsA (0,5 mg/Kg/día hasta 12,5 mg/Kg/día) durante los 21 días de tratamiento con AngII. En estos ratones analizamos el efecto de la CsA sobre el incremento del peso del corazón por AngII. Mientras que con la dosis de 0,5 mg/Kg/día de CsA no observamos efecto sobre este parámetro, a partir de la dosis 2 mg/Kg/día se redujo significativamente el incremento del peso cardiaco (Fig. 15A). Para asegurar una correcta inhibición de la ruta, en los siguientes experimentos optamos por utilizar una dosis de CsA de 5 mg/Kg/día.



**Figura 15: La inducción de hipertrofia cardiaca tras 21 días de infusión con AngII es prevenida por el tratamiento con el inhibidor de CN, CsA. A:** Peso del corazón referido al peso corporal (HW/BW) en ratones sin tratar (control), tratados con AngII y co-tratados con AngII y diferentes dosis de CsA (0,5 a 12,5 mg/Kg/día). n=5 por grupo. **B:** Peso del corazón referido al peso corporal (HW/BW, izda.) o a la longitud de la tibia (HW/TL, dcha.) en ratones sin tratar (control), tratados con AngII (AngII), con CsA (5 mg/Kg/día) (CsA) y co-tratados con CsA y AngII (CsA+AngII). n=10-15 por grupo, 3 experimentos independientes. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

El efecto de CsA sobre el desarrollo de la hipertrofia cardiaca inducida por AngII se analizó en varios experimentos en los que incluimos cuatro grupos de estudio: grupo control, grupo tratado con AngII, grupo tratado con CsA y un último grupo que fue tratado con CsA y AngII simultáneamente. Los ratones silvestres tratados con AngII durante 21 días mostraron un aumento en el peso del corazón en comparación al grupo control (Fig. 15B). El tratamiento con CsA no tuvo efecto sobre el peso cardiaco de los ratones control, pero sin embargo inhibió significativamente el incremento mediado por AngII (Fig. 15B). Dado que AngII se ha descrito como inductor de hipertrofia celular en diversos tipos celulares, analizamos el tamaño de los cardiomiocitos en secciones transversales de tejido cardiaco de estos animales. El área de los cardiomiocitos en los ratones infundidos con AngII fue significativamente mayor que en los ratones control, y este incremento del tamaño celular fue inhibido por el tratamiento con CsA (Fig. 16A). Estos resultados morfológicos e histológicos fueron corroborados por los resultados obtenidos en el análisis *in vivo* de estos animales mediante ecocardiografía (Fig. 16B). Las paredes del ventrículo izquierdo (septo interventricular y pared posterior) incrementan su

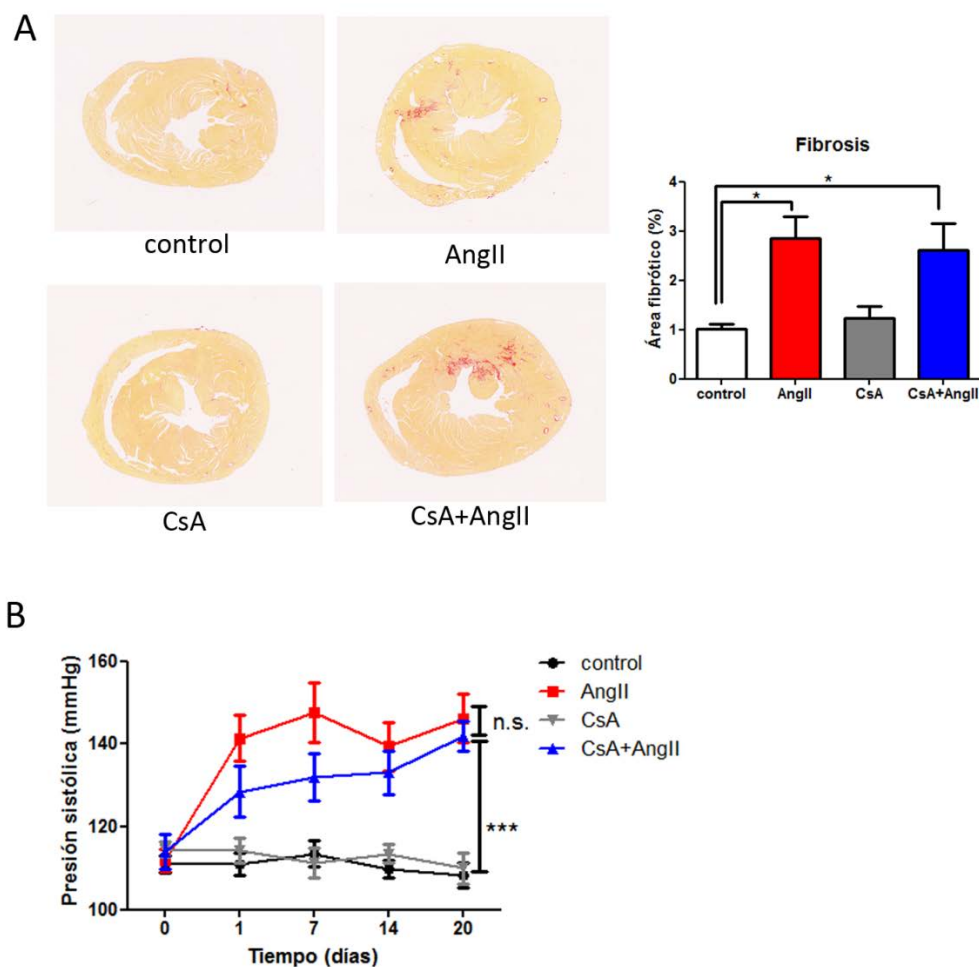
grosor tras 21 de tratamiento con AngII, y el inhibidor de CN, CsA, inhibe significativamente este incremento inducido por AngII. En los animales tratados solamente con CsA no se observó ningún efecto en estos parámetros (Fig. 16B).



**Figura 16: La inducción de hipertrofia cardíaca tras 21 días de infusión con AngII es prevenida por el tratamiento con el inhibidor de CN, CsA. A:** Imágenes representativas (objetivo 10x) de secciones transversales de corazón teñidas con lectina-FITC para delimitar el área celular (izda.) y cuantificación del área de los cardiomiocitos (dcha.) en los diferentes grupos experimentales: control, AngII, CsA y CsA+AngII. **B:** Imágenes ecocardiográficas en modo M (izda.) de corazones de animales control, AngII y CsA+AngII. Las marcas rojas indican dónde se realizaron las mediciones del septo interventricular (marca superior) y de la pared posterior (marca inferior). Representación gráfica (dcha.) del incremento de grosor de ambas paredes después de 21 días de tratamiento (mm en el día 21/mm en el día 0) en los cuatro grupos experimentales. n=10-15 por grupo, 3 experimentos independientes. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

La hipertrofia cardíaca patológica se caracteriza por la inducción de fibrosis en el tejido cardíaco. Por tanto, mediante el análisis de secciones histológicas de corazón previamente

teñidas con técnicas histológicas que detecta fibras de colágeno, determinamos el porcentaje de fibrosis en cada grupo de tratamiento. En ratones infundidos con AngII durante 21 días observamos una inducción evidente de fibrosis en la pared del miocardio que en este caso el tratamiento con CsA no fue capaz de inhibir de forma significativa (Fig17A). Aunque se ha descrito que hay una inducción de fibrosis renal y cardiaca en pacientes tratados con el inmunosupresor CsA durante largos periodos de tiempo, en nuestros ratones el tratamiento único con CsA durante 21 días a dosis que previene el desarrollo de la hipertrofia no indujo fibrosis. Este resultado nos sugiere que CsA no afecta al efecto pro-fibrótico de AngII.



**Figura 17: CsA no inhibe el aumento de fibrosis o la hipertensión arterial inducida por el tratamiento de AngII durante 21 días. A:** Imágenes representativas de sección completa de corazón (izda.) con tinción de Picrosirius Red para detectar fibras de colágeno (en color rojo); y cuantificación del área fibrótica del miocardio (dcha.) en los diferentes grupos experimentales. **B:** Representación de la presión arterial sistólica medida a diferentes días después del inicio del tratamiento con AngII en animales de los cuatro grupos experimentales. n=10-15 por grupo, 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . En el panel B se realizó un test ANOVA de dos factores.

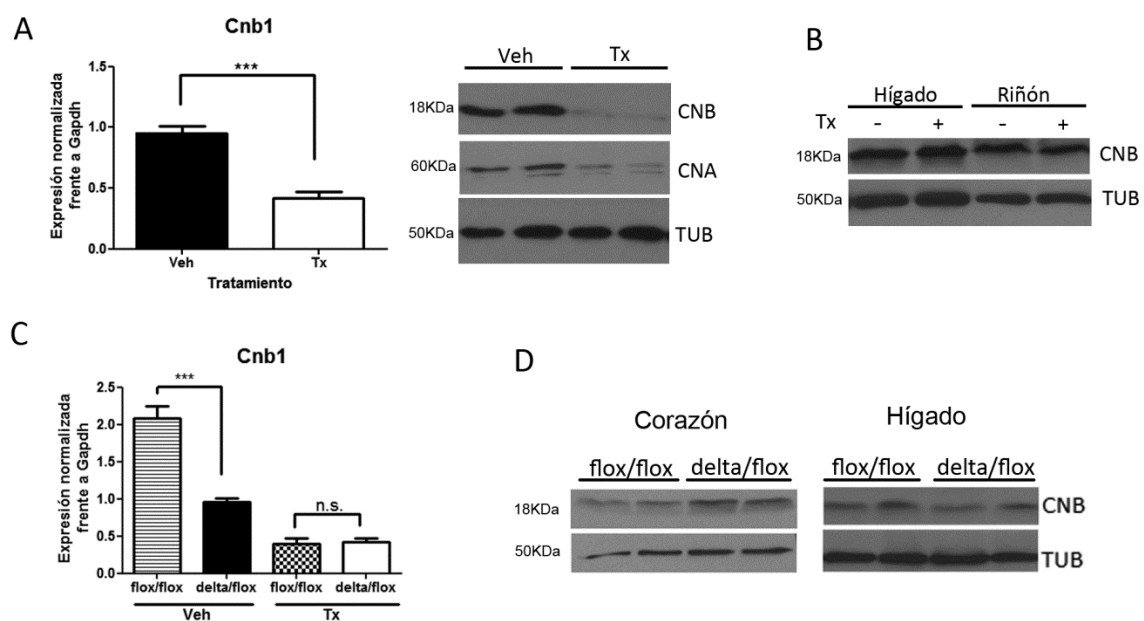
AngII es un vasoconstrictor que induce hipertensión además de hipertrofia cardiaca. Por tanto, en nuestros experimentos monitorizamos la presión arterial de los distintos grupos de tratamiento con el fin de determinar posibles efectos de CsA sobre la hipertensión mediada por AngII. Los ratones tratados con AngII mostraron un aumento significativo de su presión arterial sistólica después de tan solo 1 día de tratamiento, manteniéndose con una presión arterial elevada durante todo el estudio. Aunque se ha descrito la hipertensión como un efecto secundario en pacientes tratados con CsA, en nuestro modelo los ratones tratados sólo con CsA no presentaban signos de hipertensión. Finalmente, aunque el tratamiento con CsA redujo el desarrollo de la hipertrofia cardiaca, no fue capaz de inhibir de forma significativa el incremento de presión arterial inducido por AngII tras 21 días de tratamiento (Fig. 17B).

***La delección selectiva del gen Cnb1 en cardiomiocitos inhibe la inducción de hipertrofia cardiaca y fibrosis mediada por AngII.***

Para llevar a cabo el segundo abordaje experimental con el que caracterizar la contribución de la CN en el desarrollo de hipertrofia cardiaca durante la etapa adulta, generamos ratones para deleccionar de forma inducible y cardioespecífica la CN. Para ello cruzamos ratones de genotipo Myh6-CreEsr1 con otros de genotipo Cnb1<sup>Δf</sup>, obteniendo animales de genotipo Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δf</sup>. El tratamiento de estos ratones con tamoxifeno (Tx) activa la proteína Cre específicamente en los cardiomiocitos, produciendo la recombinación del fragmento y la pérdida del gen Cnb1. Una vez generamos esta línea, comprobamos el nivel de delección de Cnb1 en estos ratones. Tras la administración de 1 mg/día de Tx i.p. durante 5 días, obtuvimos muestras cardiacas en las que se analizó el nivel de expresión de CnB por qPCR y *western blotting*. Como muestra la Fig. 18A, con este protocolo obtuvimos una delección eficiente de Cnb1 ya que se observa una reducción evidente de su expresión tanto a nivel de ARNm como de proteína. Además, los niveles de proteína CnA están claramente reducidos en las muestras cardiacas, ya que la subunidad A de la CN se degrada en ausencia de CnB. La delección de Cnb1 se restringió al miocardio, ya que en el resto de tejidos analizados no se observaron diferencias de expresión de proteína CnB entre animales tratados con Tx y vehículo (Fig. 18B).

En el mantenimiento de la colonia Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δf</sup> se obtienen rutinariamente ratones de genotipo Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>f/f</sup>, es decir, con los dos alelos del gen Cnb1 flanqueados por secuencias LoxP. Dado que la Cre recombinasa podría tener menor efectividad para conseguir la recombinación de dos copias por cada célula, en los experimentos preliminares únicamente usamos ratones Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δf</sup> con una sola

copia de *Cnb1* en su genoma. Para poder incluir animales de genotipo *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>f/f</sup>* en los siguientes experimentos, decidimos analizar cuál era el nivel de delección de CnB en este genotipo tras el tratamiento con Tx. En condiciones basales este genotipo expresa el doble de ARNm de *Cnb1* en tejido cardiaco que el genotipo *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>* (Fig.18C); sin embargo los niveles de proteína CNB en corazón e hígado fueron muy similares entre ambos genotipos lo que sugiere que existe haplosuficiencia para este gen (Fig.18D). Tras el tratamiento con Tx, observamos que en los ratones *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>f/f</sup>* obteníamos también una delección eficiente de CnB, por tanto fueron incluidos en los grupos experimentales de los siguientes ensayos (Fig.18C).

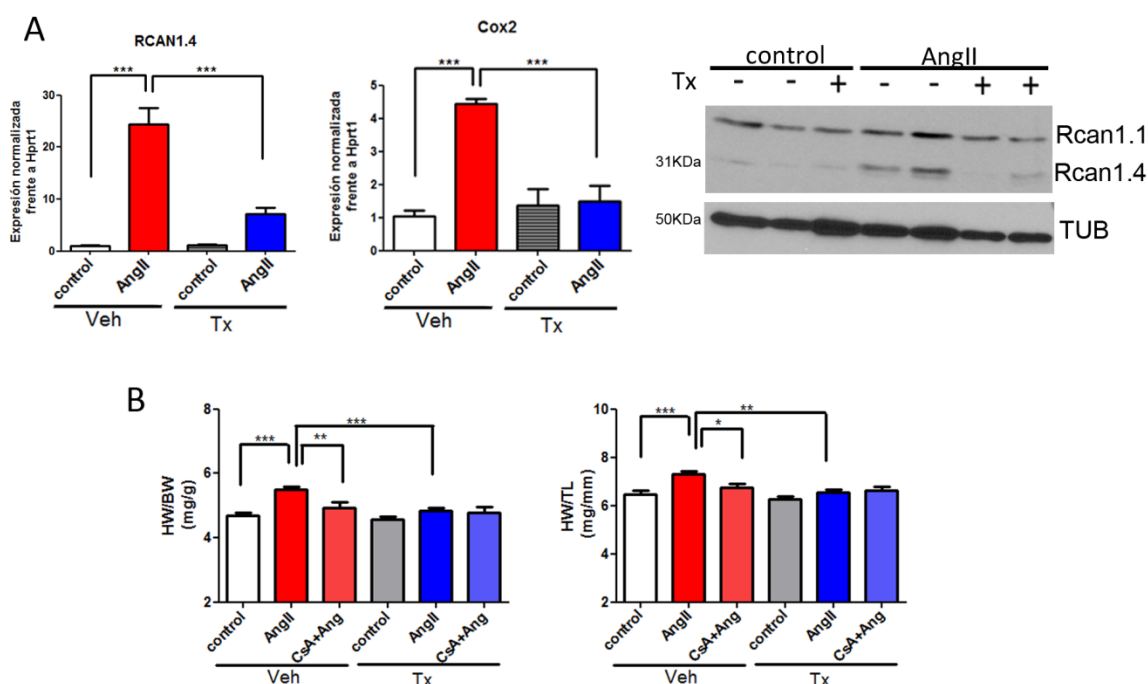


**Figura 18: El tratamiento con tamoxifeno produce la delección cardio-específica del gen *Cnb1* en los ratones *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>*. A:** Análisis mediante qPCR de la expresión de ARNm de *Cnb1* (izda.); y análisis de los niveles de proteína CnB y CnA mediante *western blotting* (dcha.) en corazones de ratones *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>* tratados durante 5 días con 1 mg/día de tamoxifeno (Tx) o vehículo (Veh). **B:** Niveles de proteína CnB en riñón e hígado de ratones tratados con Tx o Veh analizados por *western blot*. **C:** Análisis mediante qPCR de la expresión de ARNm de *Cnb1* en corazones de ratones *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>f/f</sup>* y *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>* tratados con Veh o Tx. **D:** Niveles de expresión de proteína CnB en el corazón e hígado de ratones sin tratar de ambos genotipos *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>f/f</sup>* y *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>*. \*\*\**p* < 0,001 (prueba t de Student).

Para evaluar la inhibición de la ruta CN/NFAT en el tejido cardiaco de ratones que no expresan CnB en el corazón, se implantaron mini-bombas osmóticas con AngII en estos ratones *Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>* tratados previamente con Tx o vehículo como grupo control. Tras día 1 de infusión con AngII, observamos inducción de la expresión de los genes *Rcan1.4* y *Cox2* en tejido cardiaco en ratones control pero no en los que previamente se había eliminado el gen



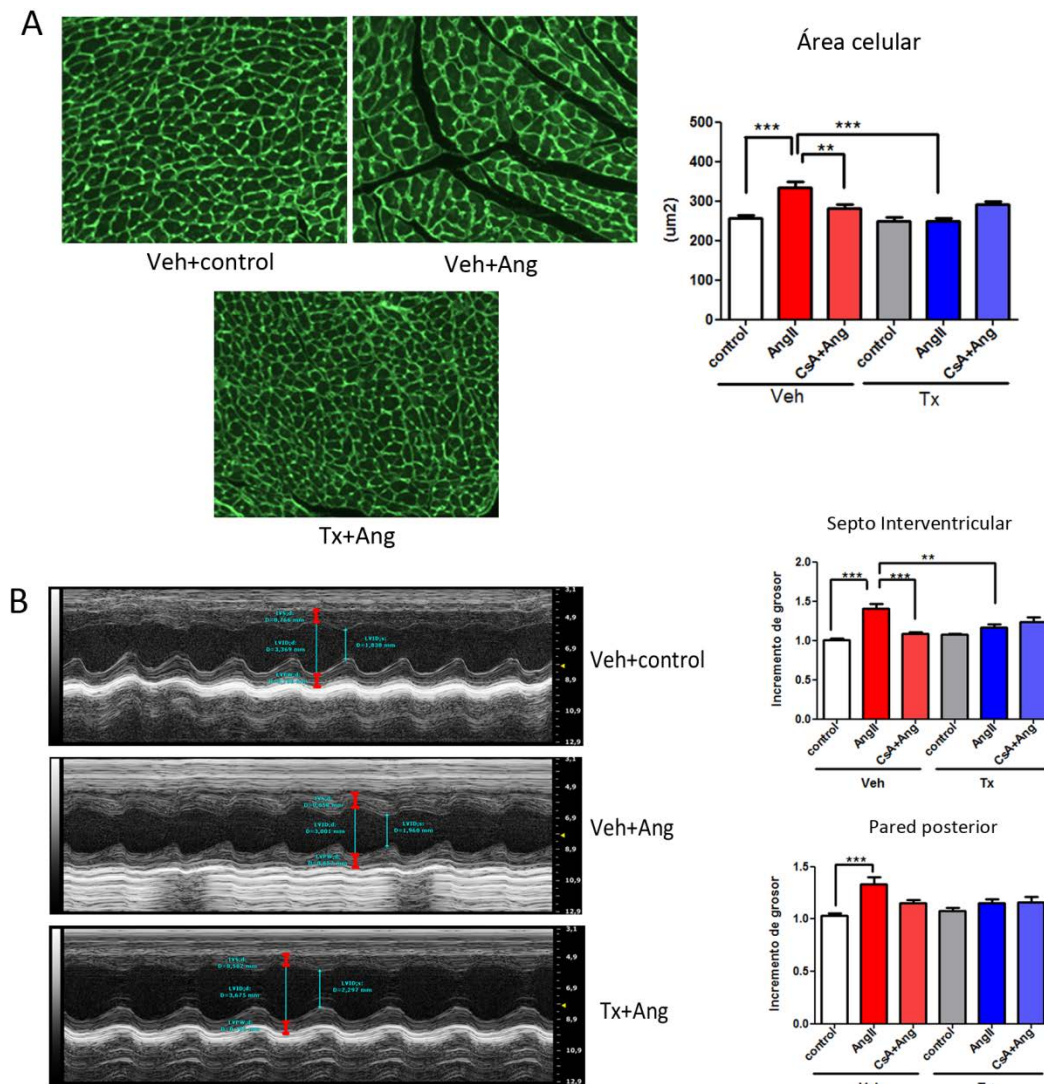
*Cnb1* con Tx. (Fig. 19A). Esto indicaba que el sistema de delección inducible de CnB en el corazón interfería eficazmente con la activación de la ruta CN/NFAT.



**Figura 19: La delección selectiva del gen *Cnb1* en cardiomiocitos inhibe la inducción de hipertrofia mediada por AngII.** **A:** Análisis de los niveles de expresión de los genes diana, Rcan1.4 y Cox2, mediante qPCR (izda.) tras 24 horas de tratamiento con AngII (1 µg/Kg/min.) en corazón de ratones Myh6-CreEsr1 *Cnb1*<sup>Δ/f</sup> tratados con Veh o Tx. *Western blot* de Rcan1 extractos de corazón de los ratones anteriores. n=5 por grupo. **B:** Peso del corazón referido al peso corporal (HW/BW, izda.) o a la longitud de la tibia (HW/TL, dcha.) en ratones con o sin delección de CnB cardíaca después de 21 días bajo 3 tratamientos diferentes: **control**, **AngII**, o **CsA+AngII**. n=10-20 por grupo, 3 experimentos independientes. \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001.

Realizamos experimentos de inducción de hipertrofia cardíaca mediada por AngII en esta línea de ratones, siguiendo el mismo protocolo que usamos para los ratones silvestres. En los ratones Myh6-CreEsr1 *Cnb1*<sup>Δ/f</sup> tratados con Tx, la ausencia de CnB cardíaca confirió a los ratones resistencia frente a la inducción de la patología hipertrófica por AngII; en estos ratones observamos una disminución del peso del corazón frente al peso corporal o la longitud de la tibia en comparación a los animales sin delección de CnB y tratados con AngII (Fig. 19B). Además, los ratones tratados con Tx no presentaron un aumento del área de sus cardiomiocitos en respuesta a AngII (Fig. 20A). El análisis ecocardiográfico reveló que el incremento del grosor de las paredes ventriculares inducido por AngII estaba reducido en estos ratones sin CnB frente al observado en los ratones con expresión de CnB (Fig. 20B).

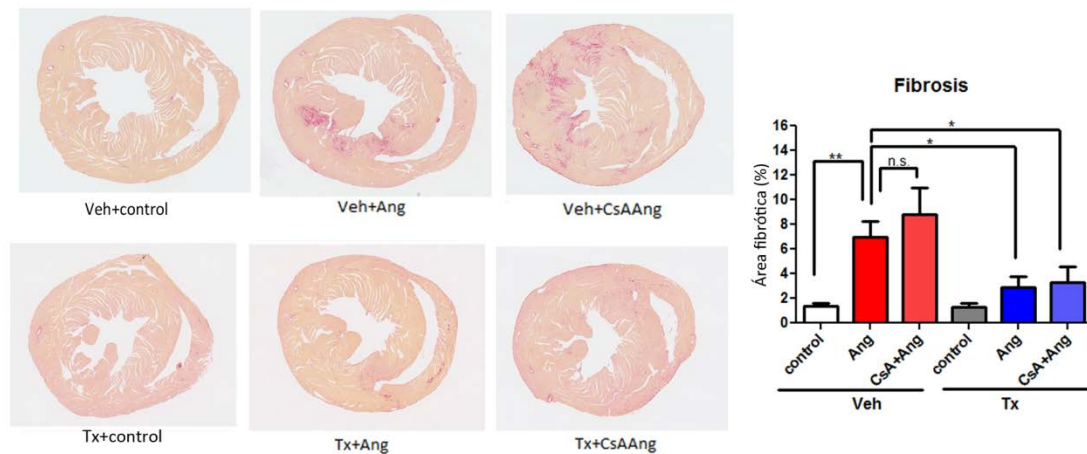




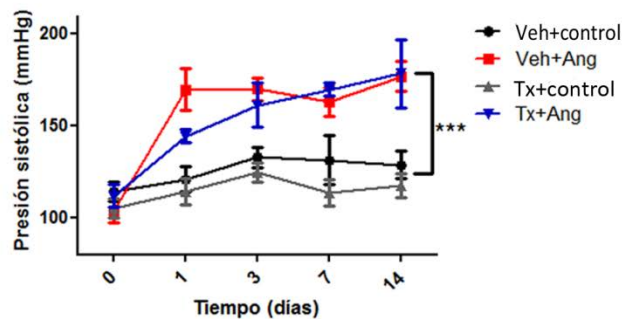
**Figura 20: La delección selectiva del gen *Cnb1* en cardiomiocitos inhibe la inducción de hipertrofia mediada por AngII. A:** Imágenes representativas (objetivo 10x) de secciones transversales de corazón teñidas con lectina-FITC para delimitar el área celular (izda.) en los ratones *Myh6-CreEsrr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>* con o sin expresión de CnB cardíaca tratados o no con AngII. Cuantificación del área de los cardiomiocitos (dcha.) en las secciones cardíacas de dichos ratones con tratamiento de AngII o CsA+AngII o sin tratar. *n*=10-20 por grupo, 3 experimentos independientes. **B:** Imágenes ecocardiográficas en modo M (izda.) de animales *Myh6-CreEsrr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup>* con o sin expresión de CnB cardíaca tratados o no con AngII. Las marcas rojas indican dónde se realizaron las mediciones del septo interventricular (marca superior) y de la pared posterior (marca inferior). Representación gráfica (dcha.) del incremento de grosor de ambas paredes después de 21 días de tratamiento (mm en el día 21/mm en el día 0) en los seis grupos experimentales. *n*=10 por grupo, 2 experimentos independientes. \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001.

Más reseñable fue el efecto que se obtuvo sobre la fibrosis miocárdica en estos experimentos; mientras que los ratones tratados con vehículo respondían al tratamiento con AngII generando una notable fibrosis en el miocardio, los deficientes en CnB, mostraron una reducción significativa del área fibrótica (Fig. 21A). Esto sugiere que la inducción de fibrosis en el corazón en respuesta a AngII es un evento dependiente de la CN de los cardiomiocitos.

A



B



**Figura 21: La delección cardio-específica de CnB previene la fibrosis cardiaca pero no la hipertensión mediadas por AngII. A:** Imágenes representativas de sección completa de corazón (izda.) con tinción de Picrosirius Red para detectar fibras de colágeno (en color rojo); y cuantificación del área fibrótica del miocardio (dcha.) en los diferentes grupos experimentales. n=10-20 por grupo, 4 experimentos independientes. **B:** Representación de la presión arterial sistólica medida a diferentes días después del inicio del tratamiento con AngII en animales con o sin delección de CnB cardiaca. n=5 por grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . En el panel B se realizó un test ANOVA de dos factores.

Debido a las diferencias en el desarrollo de fibrosis que observamos entre los dos modelos *in vivo* de inhibición de CN, nos planteamos que la CsA podría tener efectos secundarios induciendo fibrosis e independientes de CN. Por tanto, analizamos el efecto del tratamiento con CsA sobre la inducción de la hipertrofia cardiaca en ausencia de CN (Fig. 19, 20 y 21). Los ratones Myh6-CreEsr1 Cnb1<sup>Δ/f</sup> sin el tratamiento con Tx pero tratados con CsA presentaron una respuesta a AngII similar a los ratones de genotipo silvestre en los parámetros hipertroáficos y en la inducción de fibrosis. Los ratones de la misma línea tratados con Tx, y por tanto sin expresión de CN, no mostraron ningún efecto adicional sobre los parámetros hipertroáficos inducidos por AngII cuando recibieron tratamiento con el inhibidor de CN, CsA. Respecto a la fibrosis, sorprendentemente, el co-tratamiento con CsA+AngII de los ratones con deficiencia en CN no producía un aumento en la fibrosis observada. Estos resultados sugerían

que el efecto del tratamiento con CsA sobre fibrosis cardiaca inducida por AngII es dependiente de la presencia de CN.

Cuando estudiamos la presión arterial, los ratones con infusión de AngII, tanto los controles como los tratados con Tx, presentaron hipertensión (Fig. 21B). Por lo tanto, aunque en los ratones del grupo con tratamiento de Tx y AngII no hay hipertrofia cardiaca, la delección de CN no produjo una disminución de esta hipertensión arterial.

La ausencia de CN cardiaca en ratones control que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento no produjo efectos relevantes en ninguno de los parámetros analizados. Esto nos indicaba que la perdida de función CN, al menos durante el mes de estudio, no afecta a la homeostasis cardiaca en ratones adultos.

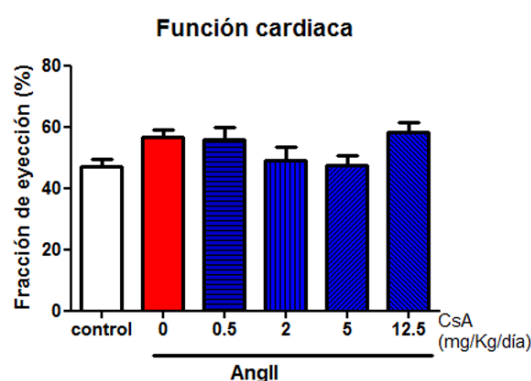
### *La función cardiaca no es alterada por la inhibición o ausencia de CN en cardiomiocitos*

Existen resultados contradictorios en la bibliografía sobre el efecto del inhibidor farmacológico CsA en la función cardiaca. En algunos casos se describe que CsA causa disfunción cardiaca y en otros no (Lim et al., 2000, Oflaz et al., 2004, Di Marco et al., 2011, Meguro et al., 1999, Laudi et al., 2007). En nuestros experimentos usando 5mg/kg/día de CsA para determinar su efecto sobre hipertrofia cardiaca analizamos por ecocardiografía la fracción de eyección de dichos animales. Este parámetro establece la función sistólica del corazón, que durante la hipertrofia cardiaca inducida por AngII se mantiene preservada. El análisis de los datos obtenidos no reveló un efecto significativo de disfunción cardiaca mediado por CsA (Tabla 4). Sin embargo, existe una tendencia en los datos que indican una posible reducción de la fracción de eyección mediada por CsA en algunos ensayos.

**Tabla 4: Valores de los parámetros ecocardiográficos en ratones silvestres después de 21 días con distintos tratamientos.** **IVS:** Espesor del septo interventricular; **LVPW:** Espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo; **LVIDd:** Diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole; **LVIDs:** Diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole; **EF:** Fracción de eyección; **F.C.:** Frecuencia cardiaca. Los datos presentan la media  $\pm$  SD n=10-20 por grupo, 3 experimentos independientes \* $p$ <0.05 vs sham; (\$)  $p$ <0.001 vs sham; (&)  $p$ <0.05 vs AngII.

Parámetro	Control	AngII	CsA	CsA+AngII
<b>IVS (mm)</b>	0.75 $\pm$ 0.07	0.91 $\pm$ 0.13 <sup>\$</sup>	0.78 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.098 <sup>*,&amp;</sup>
<b>LVPW (mm)</b>	0.73 $\pm$ 0.07	0.89 $\pm$ 0.18 <sup>\$</sup>	0.70 $\pm$ 0.02	0.80 $\pm$ 0.13 <sup>&amp;</sup>
<b>LVIDd (mm)</b>	3.90 $\pm$ 0.25	3.64 $\pm$ 0.45 <sup>*</sup>	3.86 $\pm$ 0.25	3.77 $\pm$ 0.25
<b>LVIDs (mm)</b>	2.88 $\pm$ 0.32	2.73 $\pm$ 0.48	2.89 $\pm$ 0.28	2.91 $\pm$ 0.28
<b>EF (%)</b>	51.33 $\pm$ 6.06	52.00 $\pm$ 8.11	49.9 $\pm$ 7.08	46.25 $\pm$ 8.38
<b>F.C. (latidos/min)</b>	483 $\pm$ 50	517 $\pm$ 47	527 $\pm$ 66	494 $\pm$ 64

Dado que una de las variables en los estudios publicados sobre CsA y función cardiaca es la diversidad de dosis utilizadas del fármaco, nos planteamos analizar si el efecto de CsA sobre la función cardiaca era dependiente de dosis. Tras tratar ratones silvestres con AngII durante 21 días junto con distintas dosis de CsA (0,5 a 12,5 mg/Kg/día) realizamos el estudio ecocardiográfico de los animales (Fig. 22). Sin embargo, no encontramos ningún cambio significativo asociado a la dosis de CsA empleada en la fracción de eyección.



**Figura 22: La función sistólica no se ve afectada por CsA a diferentes dosis.** Representación gráfica de la fracción de eyección en corazones de ratones tratados con AngII (1 µg/Kg/min.) durante 21 días en ausencia o presencia de CsA a distintas dosis (0,5 a 12,5 mg/Kg/día). n=5 por grupo.

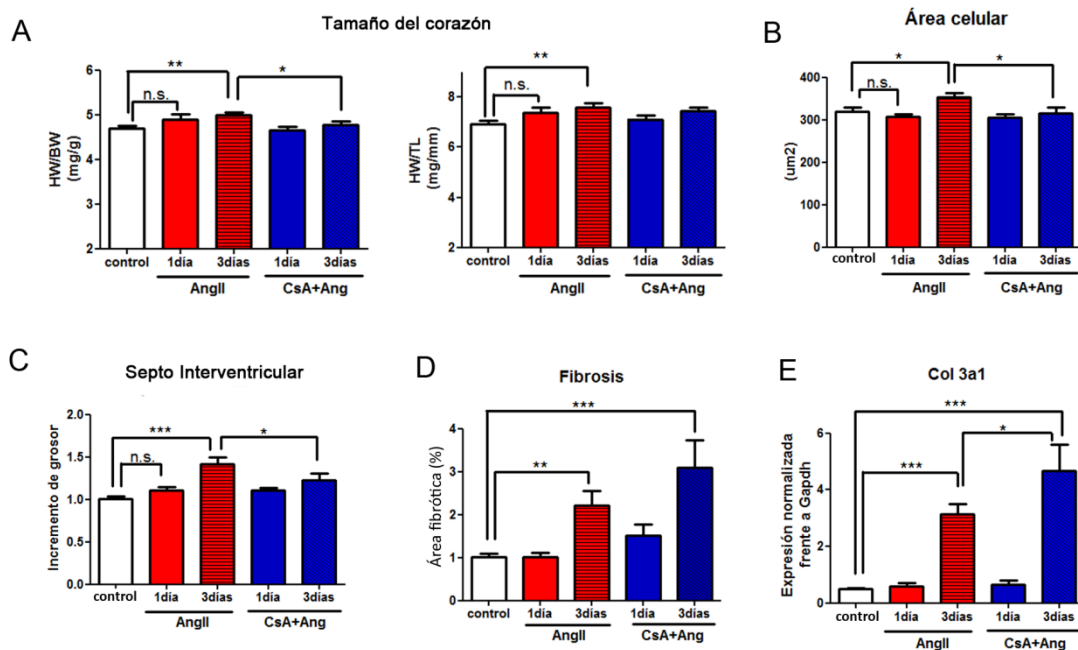
La función cardiaca también se examinó en los ratones sin expresión de CN cardiaca tras los diversos tratamientos. La ausencia de CN en el corazón adulto, al menos durante el tiempo de estudio, no indujo disfunción sistólica en los ratones control ni en los ratones tratados con AngII (Tabla 5). En presencia de CsA, tampoco encontramos un descenso de la fracción de eyección en este fondo genético (Tabla 5).

**Tabla 5: Valores de parámetros ecocardiográficos en ratones Myh6-CreEsrr1 Cnb1<sup>Δf</sup> después de 21 días con distintos tratamientos.** IVS: Espesor del septo interventricular; LVPW: Espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo; LVIDd: Diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole; LVIDs: Diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole; EF: Fracción de eyección; F.C.: Frecuencia cardiaca. Los datos presentan la media ± SD. n=10 por grupo, 2 experimentos independientes. (\*)p<0.05 vs sham; (\$)p<0.001 vs sham; (&)p<0.05 vs Veh+AngII; (x)p<0.01 vs Veh+AngII; (#)p<0.001 vs Veh+AngII

Parámetro	Veh			Tx		
	Control	AngII	CsA+AngII	Control	AngII	CsA+AngII
IVS (mm)	0.72 ± 0.05	0.94 ± 0.13 <sup>\$</sup>	0.71 ± 0.06 <sup>&amp;</sup>	0.74 ± 0.07	0.84 ± 0.08 <sup>#</sup>	0.79 ± 0.09 <sup>&amp;</sup>
LVPW (mm)	0.71 ± 0.06	0.99 ± 0.13 <sup>\$</sup>	0.85 ± 0.11 <sup>&amp;</sup>	0.80 ± 0.08	0.86±0.07 <sup>*,‡</sup>	0.81 ± 0.12 <sup>&amp;</sup>
LVIDd (mm)	3.72 ± 0.29	3.36 ± 0.46	3.67 ± 0.34	3.54 ± 0.36	3.37 ± 0.27	3.40 ± 0.27
LVIDs (mm)	2.85 ± 0.31	2.41 ± 0.37	2.70 ± 0.37	2.40 ± 0.41	2.48 ± 0.31	2.53 ± 0.34
EF (%)	48.6 ± 5.90	55.8 ± 6.59	53.0 ± 5.10	61.8 ± 7.44 <sup>*</sup>	52.3 ± 7.52	51.2 ± 8.47
F.C. (lat/min)	504 ± 69	572 ± 38	560 ± 47	542 ± 84	523 ± 57	558 ± 40

## Estudio cinético de la hipertrofia cardiaca mediada por AngII

Una de las cuestiones que aún no han sido estudiadas en detalle es cuándo comienza a manifestarse el fenotipo hipertrófico inducido por AngII. Por ello, realizamos una serie de experimentos en ratones silvestres infundidos con AngII durante 1 y 3 días en los que analizamos los distintos parámetros hipertróficos. Como se observa en la Fig. 23A., tras sólo 24 horas del inicio del tratamiento existe una tendencia clara al incremento del peso del corazón, mientras que a día 3 este aumento ya es significativo. Tanto el aumento en el área del cardiomiocito como el incremento de grosor del septo interventricular también comienzan a ser evidentes después de tres días de tratamiento con AngII (Fig. 23B y C). En paralelo, observamos que la inducción de fibrosis en el miocardio mediada por AngII ocurría al mismo tiempo (Fig. 23D). Además, el efecto inhibitorio de CsA sobre la hipertrofia cardiaca mediada por AngII se manifestó después de tan solo tres días de tratamiento hipertrófico, mientras que CsA, al igual que ocurría en los ensayos a tiempos largos, no fue capaz de bloquear la inducción de fibrosis en el miocardio de los ratones tratados con AngII. De hecho, los animales tratados con CsA presentaban una mayor tendencia a desarrollar fibrosis cardiaca que fue confirmada



**Figura 23: Cinética temprana de la hipertrofia cardiaca mediada por AngII.** En ratones silvestres tratados durante 1 o 3 días con AngII en ausencia o presencia de CsA se analizaron los diferentes parámetros hipertróficos. **A:** Peso del corazón respecto del peso corporal (HW/BW) o la longitud de la tibia (HW/TL); **B:** área de los cardiomiocitos en secciones transversales de corazón; **C:** Incremento del espesor del septo interventricular medido por ecocardiografía; **D:** área fibrótica en secciones de corazón; **E:** niveles de ARNm de colágeno III (Col3a1) analizados por qPCR. n=10 por grupo. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ . En el caso de las gráficas del panel A, el análisis de varianza daba un resultado significativo; pero el post-test Newman-Keuls no, por lo que se realizó un test t de Student para conocer la significación entre los grupos.

por los resultados obtenidos al determinar los niveles de expresión de colágeno III por PCR cuantitativa. AngII inducía la expresión de colágeno III en el tejido cardíaco tras tres días de tratamiento, y la presencia de CsA incremento significativamente la inducción mediada por AngII (Fig. 23E). El conjunto de estos resultados indicaba que los eventos activados por AngII que dan lugar al desarrollo de la hipertrofia cardíaca tienen lugar durante las fases iniciales del tratamiento, y que parte de ellos son dependientes de CN.

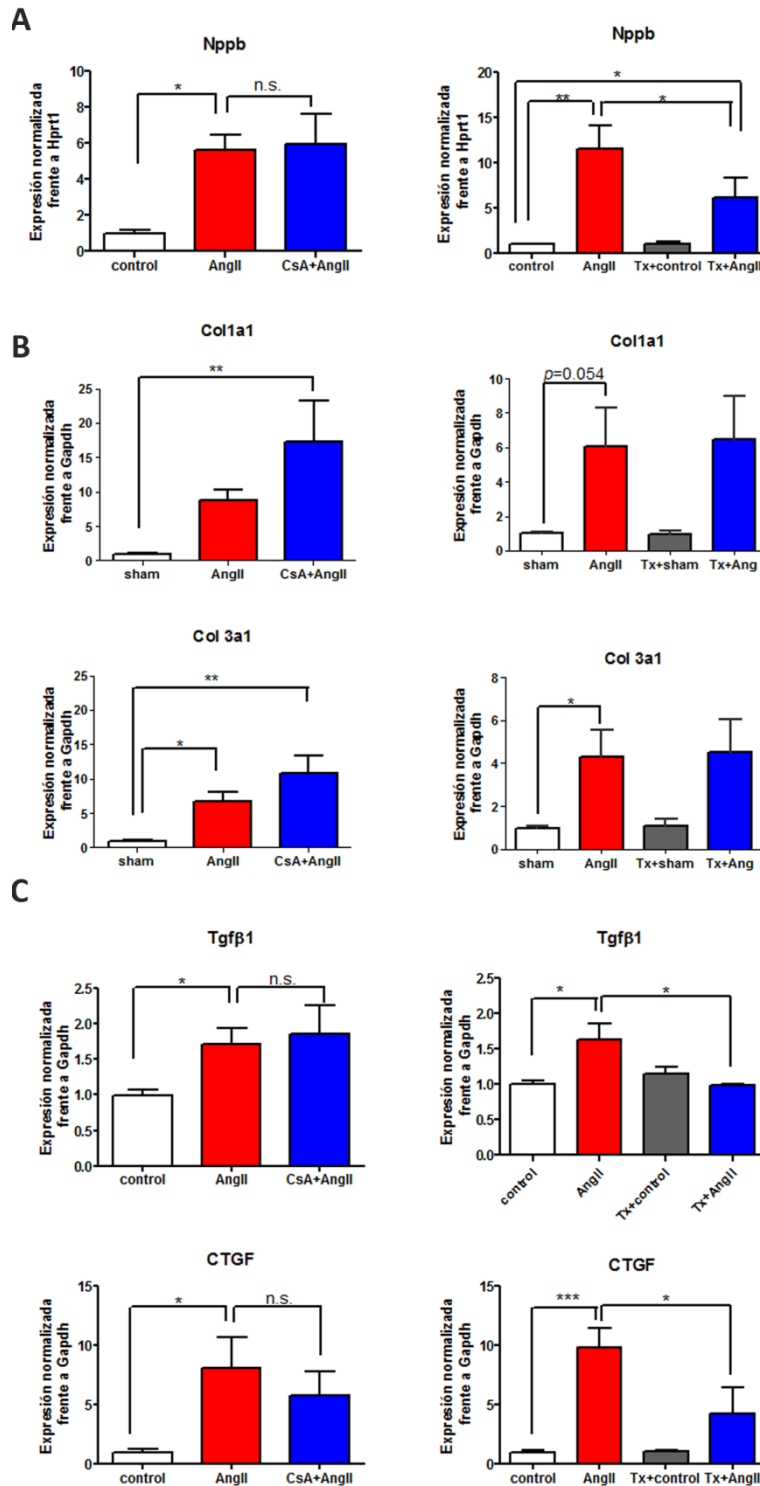
### ***Análisis del papel de CN en la expresión de colágenos y la activación de la ruta TGF $\beta$***

Los resultados anteriores indicaban que AngII desencadena una respuesta pro-fibrótica temprana en nuestro modelo *in vivo* de hipertrofia cardíaca de forma dependiente de CN, mientras que la inhibición farmacológica con CsA no era capaz de prevenirla. Esto sugería que AngII podía disparar la activación de un programa génico temprano que desencadenara esta respuesta. Dado que experimentos previos mostraron que la expresión de colágeno III en ratones silvestres tratados durante 3 días con CsA y AngII correlacionaba con el análisis histológico de la fibrosis en este modelo, se estudió la expresión génica de los tipos principales de colágeno que forman parte del tejido cardíaco, colágeno I (Col1a1) y colágeno III (Col3a1). Se ha relacionado ampliamente la fibrosis con la activación de la ruta TGF $\beta$ , por lo que decidimos estudiar la expresión génica temprana de dos miembros de esta ruta, TGF $\beta$ 1 y CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo), en corazones de ratones de los dos modelos. Además, estudiamos la expresión del gen Nppb (Péptido natriurético cerebral), cuya inducción es considerada un marcador de estrés cardíaco.

Para ello, tratamos ambos tipos de ratones con AngII durante 24h, aislamos ARNm de tejido cardíaco y determinamos la expresión de los genes por PCR cuantitativa. AngII indujo el incremento de expresión de Nppb pero dicha inducción no se modificó tras inhibir la CN con CsA, mientras que sí se redujo significativamente tras la delección de CnB (Fig. 24A).

En ratones con delección de CN y tratados con AngII durante tres días, y a pesar de que en este modelo genético se produce inhibición de fibrosis cardíaca, la expresión de los dos tipos de colágeno era tan elevada como en los ratones sin delección. Sin embargo, en los animales tratados con CsA ambos colágenos estaban expresados a un nivel mayor que en los animales sólo tratados con AngII (Fig. 24B).





**Figura 24: Análisis de la expresión génica inducida por el tratamiento con AngII en corazón y su dependencia de CN.** En ratones silvestres tratados con AngII o CsA+AngII (izda.) y ratones Myh6-CreEsrl Cnb1<sup>Δ/f</sup> con o sin delección de CnB tratados con AngII (dcha.) se analizó la expresión de ARNm de distintos genes por qPCR: **A:** Niveles de ARNm del gen marcador de estrés cardíaco, Nppb, tras 1 día de tratamiento con AngII; **B:** niveles de ARNm de los dos tipos de colágeno que se encuentran en la matriz cardíaca, Col1a1 y Col3a1, tras 3 días de tratamiento con AngII; y **C:** niveles de ARNm de los genes TGFβ1 y CTGF, tras 1 día de tratamiento con AngII. n=5-6 por grupo. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . En el caso del gen de colágeno III en el modelo de delección (B, abajo derecha) y del TGFβ1 en los animales de genotipo silvestre (C, arriba izquierda), se realizó un test t de Student.

En el caso de TGF $\beta$ 1 y CTGF, se observó que CsA no era capaz de inhibir su expresión (Fig. 24C). Sin embargo, en los ratones donde la CN estaba ausente en sus cardiomiocitos, el aumento de expresión de estos genes tras el tratamiento con AngII estaba claramente inhibido (Fig. 24C).

## TERAPIA GÉNICA CONTRA LA RESPUESTA HIPERTRÓFICA CARDIACA MEDIADA POR CN

### *Expresión transgénica cardiaca vía transducción lentiviral*

En nuestro laboratorio se han usado vectores lentivirales expresando el péptido inhibidor de CN, LxVP, fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP), y se ha conseguido interferir el desarrollo de diversas patologías en las que la ruta CN/NFAT está implicada, tales como la artritis reumatoide, el desarrollo de aneurismas abdominales aórticos o la aterosclerosis (Escolano et al., 2014, Esteban et al., 2011, Mendez-Barbero et al., 2013). Por tanto, dado que la activación de la ruta está relacionada con la inducción de hipertrofia cardiaca, decidimos aplicar esta herramienta en la prevención de la inducción de hipertrofia cardiaca inducida por AngII.

Debido a que nuestra experiencia nos indicaba que tras la inoculación intravenosa de partículas lentivirales se obtiene una alta infección de las células de músculo liso vascular o de los hepatocitos, dependiendo de si la vía de administración es yugular o a través de la vena caudal, respectivamente, uno de los retos iniciales fue tratar de restringir la expresión del transgén a las células cardiacas. Por ello, diseñamos un nuevo vector en el que la proteína de fusión GFP-LxVP o su versión mutante se expresara bajo un promotor específico de cardiomiocitos, el de la cadena pesada de la miosina alfa ( $\alpha$ MHC). Este promotor tiene un tamaño de 5,5Kb, lo cual excedía la capacidad de empaquetamiento del lentivirus; por lo tanto decidimos usar un fragmento de 700bp de este promotor que contenía el promotor mínimo. Una vez clonamos el nuevo promotor, generamos los nuevos lentivirus que denominamos MHC-GFP, MHC-LxVP y MHC-Mut (Métodos, fig. 12).

En experimentos *in vitro* comprobamos la especificidad de los lentivirus generados. Solo en células de línea cardiaca (H9c2) infectadas con el lentivirus MHC-GFP se producía expresión específica de GFP, mientras que no se observaba cuando infectamos células de

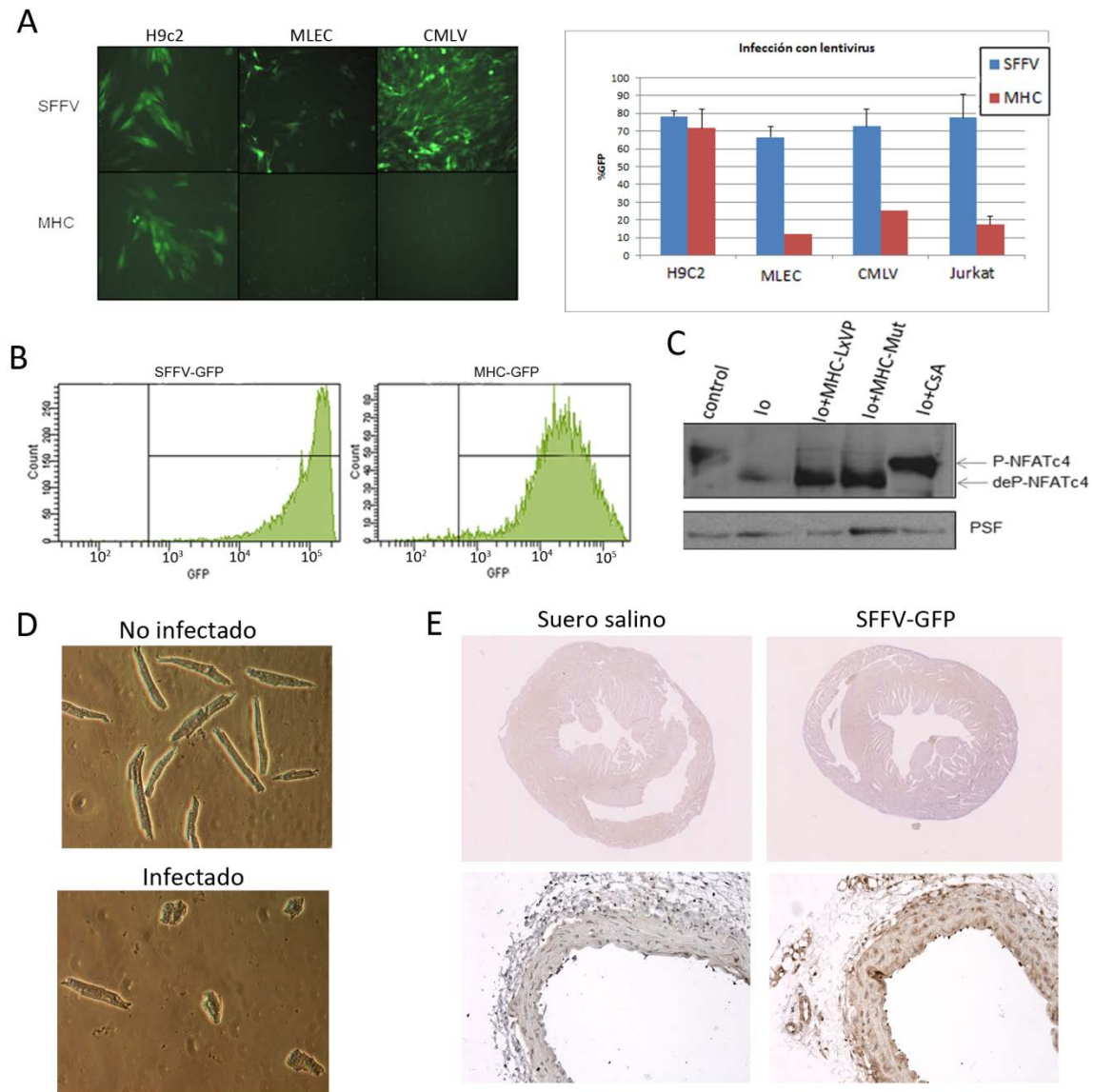


origen vascular (CMLV) o endotelial (MLEC) (Fig. 25A). Estos resultados indicaban que el promotor elegido estaba funcionando específicamente solo en células cardíacas.

Aunque la especificidad del promotor utilizado fue evidente, su potencia fue baja. El perfil de expresión de GFP obtenido por citometría de flujo de células infectadas *in vitro* por el lentivirus con el promotor  $\alpha$ MHC reveló una menor expresión de la proteína al compararlo con el perfil de células infectadas con su homólogo dirigido por el promotor viral SFFV (Fig. 25B). De hecho, estos niveles de expresión alcanzados fueron insuficientes para que el transgen conteniendo LxVP inhibiese la desfosforilación de NFAT mediada por ionóforo de calcio (Io) en células H9c2 (Fig. 25C). En paralelo, aislamos y mantuvimos en cultivo cardiomiocitos de ratón adulto e intentamos infectar estas células; pero no obtuvimos infección del cardiomiocito, de hecho, observamos que la infección inducía la muerte de las células (Fig. 25D).

Estos resultados nos hicieron descartar el uso de los lentivirus MHC-GFP *in vitro*, pero quisimos probar si con la inoculación yugular de partículas lentivirales con el promotor SFFV en ratones adultos se conseguía transducir el corazón. En el análisis inmunohistoquímico para GFP en secciones de estos corazones, no detectamos expresión de GFP, a pesar de que las células de la pared aórtica se habían infectado eficientemente (Fig. 25E).

El conjunto de estos resultados indicaban la ineficacia del uso de vectores lentivirales para infectar el miocardio por lo que descartamos esta aproximación experimental para bloquear la inducción de hipertrofia cardíaca a través de la expresión del péptido inhibidor de CN, LxVP.



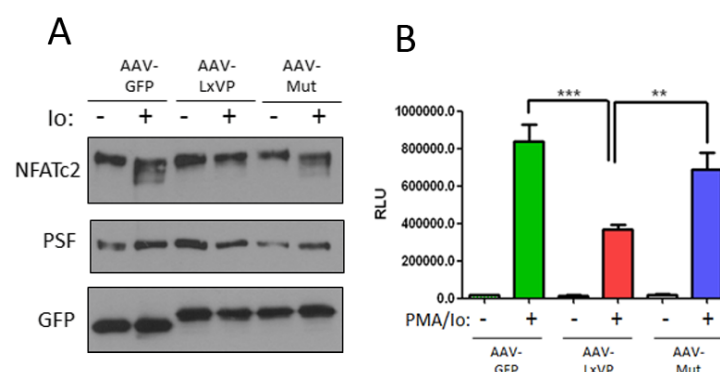
**Figura 25: Infección lentiviral de cardiomiocitos *in vitro* e *in vivo*.** **A:** Imágenes de células H9c2, MLEC y CMLV infectadas con lentivirus que expresan GFP bajo un promotor cardíaco (MHC-GFP) o uno viral (SFFV-GFP) obtenidas por microscopía de fluorescencia (objetivo 10x) (izqda.) y cuantificación del porcentaje de células infectadas analizado por citometría de flujo (dcha.). **B:** Perfil de expresión de proteína GFP (media de la intensidad de fluorescencia) en células H9c2 infectadas con el SFFV-GFP y el MHC-GFP analizadas por citometría de flujo. **C:** Western blot de NFATc4 en extractos proteicos de células H9c2 infectadas con el lentivirus que expresa el péptido inhibidor LxVP o su versión mutada bajo el promotor cardíaco (MHC-LxVP y MHC-Mut, respectivamente) y estimuladas con ionóforo de calcio (Io, 1  $\mu$ M) durante 30 min. Las flechas indican el estado de desfosforilación de NFATc4, P-NFATc4 (fosforilado e inactivo) y deP-NFATc4 (desfosforilado y activo), como control positivo de inhibición de la activación de NFATc4 se analizaron células co-tratadas con Io (1  $\mu$ M) y CsA (200 ng/ml). **D:** Imágenes de cardiomiocitos de ratón adulto infectados o no con lentivirus SFFV-GFP obtenidas por microscopía (objetivo 10x). **E:** Inmunohistoquímica para detectar proteína GFP en sección completa de corazones de ratones inoculados intravenosamente (i.v.) con suero salino o con lentivirus SFFV-GFP (imágenes superiores). Inmunohistoquímica para detectar proteína GFP en sección de aortas de los ratones anteriores (objetivo 20x) (imágenes inferiores).

## ***Vectores adeno-asociados producen la inhibición de la ruta CN/NFAT in vitro e infecta el corazón in vivo.***

Tras los resultados obtenidos con los vectores lentivirales, y dada la eficacia demostrada por los vectores derivados de virus adeno-asociados (AAV), concretamente, del serotipo 9, para transducir células cardíacas, utilizamos estos vectores por su tropismo hacia los cardiomiocitos.

Por lo tanto, decidimos utilizar este abordaje y obtuvimos los esqueletos del AAV, tanto el de cadena sencilla (ss) como el de cadena doble o auto-complementaria (ds), sobre los cuales clonamos la secuencia GFP-LxVP que usamos en los lentivirus bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV) (Métodos, fig. 13).

El plásmido generado inhibió la activación de la CN, ya que células Hek293T transfectadas con el plásmido dsAAV-LxVP no mostraban desfosforilación de NFAT cuando se las estimulaba con Io, mientras que en las que habían sido transfectadas con su equivalente mutado (dsAAV-Mut) o con el plásmido sin la secuencia LxVP (dsAAV-GFP) se apreciaba el cambio de movilidad correspondiente a la desfosforilación de NFAT (Fig.26A). Esto se corroboró también en ensayos de actividad transcripcional, en los que células Hek293T transfectadas con el dsAAV-LxVP y un plásmido que expresa la proteína luciferasa bajo un promotor activado por NFAT y estimuladas con Io no eran capaces de producir el aumento de la luminiscencia que sí ocurría cuando las células eran transfectadas con el plásmido dsAAV-Mut o dsAAV-GFP (Fig.26B).

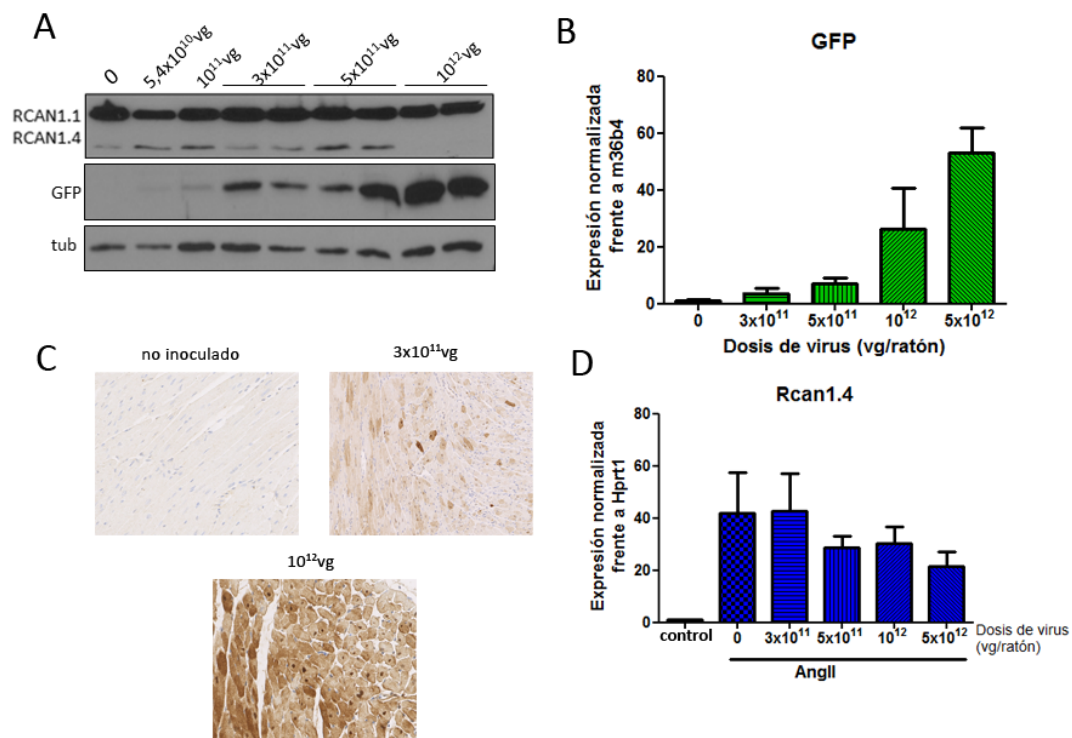


**Figura 26: La activación de la ruta CN/NFAT es inhibida en células HEK293T transfectadas con el vector dsAAV-LxVP. A:** Western blot de NFATc2 en extractos proteicos de células HEK293T transfectadas con dsAAV-GFP, dsAAV-LxVP y dsAAV-Mut y estimuladas con Io 1μM durante 30 min. **B:** Ensayo de actividad luciferasa en células HEK293T transfectadas con los plásmidos anteriores junto con un plásmido reportero luciferasa cuya expresión es dirigida por el promotor de IL-2. La actividad luciferasa se determinó después de estimular las células durante 5 h con 10 ng/ml PMA y 1 μM Io. R.L.U., unidades relativas de luz \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Después de comprobar que la construcción clonada inhibía la ruta CN/NFAT, comenzamos la producción de los virus para su uso como vector de terapia génica en ratones. Distintas cantidades del dsAAV-LxVP se inocularon en ratones a través de la vena caudal con la finalidad de realizar una curva dosis-respuesta y comprobar posibles diferencias en la expresión de GFP en el tejido cardíaco. Como se observa en la fig. 27, existe una clara correlación entre la dosis de virus inoculada y la expresión del transgén tanto en proteína como ARNm. Además, en ningún caso fuimos capaces de llegar a una dosis en la que la expresión de la proteína alcanzara un límite en el que se estabilizara, sino que esta se mantiene de forma creciente en el rango de dosis de virus que es utilizado en ratones.

Como primer acercamiento a la inhibición de CN/NFAT *in vivo*, decidimos comprobar si las dosis que probamos en el experimento anterior conseguían inhibir la ruta, analizando la expresión basal del gen diana Rcan1.4 en el corazón. La expresión basal cardíaca de Rcan1.4 desaparece sólo en el caso de la dosis más alta utilizada,  $10^{12}$  vg (Fig. 27A).

Finalmente, inoculamos diferentes concentraciones de virus ssAAV-LxVP a través de la vena caudal en ratones, esperando encontrar la dosis mínima para inhibir la activación de CN mediada por AngII *in vivo*. Para ello, se implantaron bombas osmóticas con AngII en los ratones 4 semanas después de la administración del virus, con la finalidad de observar la inhibición de CN en las mismas condiciones en las que realizaríamos los futuros ensayos de hipertrofia cardíaca, en los que la expresión de los genes diana de CN es mucho más alta que en condiciones basales, y por tanto, más difícil de inhibir. Tras 24h de tratamiento con AngII, se sacrificaron los animales y se extrajo el corazón para analizar la expresión del gen diana de CN, Rcan1.4. Sin embargo, como se observa en la (Fig. 27D), no fue posible obtener una inhibición eficiente de la expresión del gen a ninguna de las dosis ensayadas, por lo que el péptido LxVP expresado en células cardíacas no inhibe la activación de CN *in vivo* en el corazón como ocurre mediante el uso de vectores lentivirales en otras células y tejidos de ratón, entre ellos macrófagos y células de músculo liso vascular (CMLVs).



**Figura 27: Alta eficiencia de infección del vector AAV9 en corazón mediante inyección intravenosa. A:** Western blot de RCAN1 y GFP en extracto proteico de corazón de ratones inoculados i.v. con dosis crecientes de dsAAV-LxVP (vg: viral genomes, número de genomas virales). **B:** Análisis de la expresión de ARNm de GFP mediante qPCR en corazones de ratones inoculados i.v. con dosis crecientes de ssAAV-LxVP. **C:** Imágenes representativas de inmunohistoquímica para detectar proteína GFP en secciones de corazón de los ratones infectados con ssAAV-LxVP-GFP. **D:** Análisis de la expresión de ARNm de Rcan1.4 mediante qPCR en corazones de ratones infectados con distintas dosis de ssAAV-LxVP y tratados durante 24 h con AngII.



## DISCUSIÓN





La hipertrofia cardiaca es un proceso patológico que predispone al desarrollo de insuficiencia cardiaca, una de las causas de mortalidad más frecuentes a nivel mundial. Por tanto, hallar las causas del desarrollo de la hipertrofia cardiaca se ha convertido en una prioridad en el área cardiovascular, en busca de las claves que ayuden a comprender esta patología de una forma global. No en vano, la primera referencia que encontramos de esta enfermedad en una publicación científica data de 1906 (West, 1906), y un siglo después el número de publicaciones por año relacionadas con ella no ha dejado de crecer.

Si bien la hipertrofia cardiaca es un mecanismo compensatorio, adaptativo y puntual para hacer frente a una situación de estrés hemodinámico o neurohormonal, si dicho estrés se vuelve crónico, este mecanismo puede descompensarse, provocando una situación insostenible en el que el corazón va perdiendo paulatinamente su homeostasis y se crea una predisposición hacia la arritmia, la insuficiencia cardiaca y la muerte súbita (Levy et al., 1990). Independientemente del desencadenante patológico de la hipertrofia, la respuesta cardiaca acaba convergiendo en ciertas características comunes, como son el aumento de tamaño del corazón, la aparición de fibrosis, la reprogramación de la expresión génica y la alteración de la función ventricular. Por tanto, ha sido una prioridad para los científicos de esta área de conocimiento encontrar los mecanismos moleculares subyacentes que integran una gran diversidad de señales en una misma respuesta tisular.

Desde hace más de una década, existe consenso en la importancia que tiene la fosfatasa CN como molécula integradora de señales en el interior del cardiomiocito durante el desarrollo de la hipertrofia cardiaca. Sin embargo, existen lagunas en torno a cómo llegan dichas señales a conectar con CN y producir su activación, y cómo ésta, tras la desfosforilación de uno de sus principales sustratos, el factor de transcripción NFAT, puede inducir cambios en la expresión génica durante las fases tempranas de la patología que puedan dar lugar al desarrollo de la hipertrofia. En lo que respecta al primer punto, durante los últimos años ha habido importantes avances en la caracterización de microdominios y moléculas que interaccionan con CN, que dan una idea de cómo se integran las señales extracelulares en el interior del cardiomiocito, y sobre todo, cómo se diferencian molecularmente las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  necesarias para la contracción de la célula (excitación-contracción) de las propias de la señalización intracelular que activa la ruta CN/NFAT (excitación-transcripción) (Gomez et al., 2013).

En cuanto a si la implicación de CN en el proceso tiene lugar durante las fases iniciales de la patología faltan trabajos que lo aborden. Aunque la hipertrofia desarrollada en ratones

transgénicos con expresión de CN activa se revierte parcialmente tras la eliminación de la CN (Berry et al., 2011), se sigue sin saber en qué fases de la patología CN ejerce su papel. En el caso del modelo de hipertrofia inducida por AngII tampoco se ha caracterizado la cinética de su desarrollo ni la función de CN en la misma.

La inhibición de CN mediante el uso de sus inhibidores farmacológicos, CsA y FK506, en modelos animales de hipertrofia cardíaca ha dado resultados contradictorios, aunque la mayoría de estos estudios apoyan el requerimiento de CN en la inducción de la patología. Sin embargo, el uso de estos inhibidores no parece ser apropiado para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca dada la alta dosis requerida y que podría dar lugar a efectos secundarios severos. De hecho, la aplicación clínica de CsA en humanos como inmunosupresor para evitar rechazos en trasplantes de órganos puede producir fibrosis renal y cardíaca así como alteraciones en la función cardíaca (Ekberg et al., 2007, Azzi et al., 2013, Oflaz et al., 2004, Meguro et al., 1999). Dado que CsA ejerce su función inhibidora mediante su unión con la inmunofilina ciclofilina, chaperona importante para el plegamiento en la síntesis de proteínas, parte de estos efectos negativos podrían estar causados por el secuestro de esta proteína por la CsA, impidiendo realizar su función. También se ha relacionado a CsA con el aumento del estrés oxidativo a nivel celular (Buffoli et al., 2005, Rezzani, 2006). Por lo tanto, se necesitaba otro modelo que permita estudiar el papel de la CN en la patología hipertrófica que no implicara el uso de este fármaco.

En este trabajo de tesis hemos pretendido elucidar si la fosfatasa CN es un elemento clave en el desarrollo temprano de la hipertrofia cardíaca en adultos, para lo cual hemos usado un modelo de infusión del factor humoral AngII en ratón en el que se desarrolla hipertrofia acompañada por la inducción de hipertensión. Para alcanzar este objetivo hemos empleado dos aproximaciones experimentales, comparando el modelo inhibición farmacológica de CN mediante CsA con el modelo genético de delección inducible de CN que hemos desarrollado. Esto nos ha permitido diferenciar el efecto de la CsA sobre la hipertrofia cardíaca del de la ausencia de CN en el corazón.

### ***Angiotensina II y la activación de la ruta calcineurina/NFAT en el corazón***

En el modelo *in vivo* de infusión de AngII hemos comprobado que se produce la activación de la ruta CN/NFAT en el corazón, y que esta activación es temprana. En un primer abordaje, intentamos analizar directamente la activación de NFAT en tejido cardíaco; sin embargo, los ensayos de *western blotting* para detectar la desfosforilación y translocación de

la proteína NFAT en muestras tratadas con AngII mostraron una baja resolución. Por ello decidimos comprobar la activación de la ruta por medio de la expresión de dos de sus genes diana, Rcan1.4 (la isoforma inducible del gen Rcan1) y Cox2. AngII indujo en el tejido cardíaco un aumento rápido de la expresión ambos genes tanto a nivel de ARNm como de proteína. Además, el co-tratamiento con CsA en ratones infundidos con AngII inhibió tanto la expresión de Rcan1.4 como la de Cox2, comprobándose así la dependencia de CN para la expresión de ambos genes en el corazón de ratón.

AngII provoca el desarrollo de hipertrofia cardíaca, aumentando el tamaño del corazón de forma concéntrica (sin aumento de volumen de la cámara ventricular), incrementando el tamaño de los cardiomiocitos y produciendo fibrosis como eventos más importantes en esta patología. La inhibición de CN por medio de la acción de CsA revierte significativamente (60-75%), la inducción de estos efectos mediados por AngII, a excepción de la inducción de fibrosis. La CsA no inhibió de forma significativa la fibrosis inducida por AngII. Dado que se ha descrito que el tratamiento con CsA puede provocar fibrosis (Khanna et al., 2002, Laczkovics et al., 1987, Bianchi et al., 2003), una posible explicación a la incapacidad del fármaco para bloquear el remodelado fibrótico inducido por AngII podría ser un efecto pro-fibrótico del inmunosupresor independiente de su acción sobre CN. Sin embargo, cabe señalar que no parece que el fármaco CsA *per se*, al menos a esta dosis, sea responsable de un aumento de fibrosis en el miocardio, ya que el tratamiento simple con CsA no induce un incremento de fibrosis sobre los niveles basales. Sin embargo, CsA podría ejercer un efecto fibrótico sinérgico con AngII pero independiente de CN.

Además, AngII provocó un aumento en la presión arterial en nuestros ratones, como era esperado por su efecto vasoconstrictor. Sin embargo, el co-tratamiento con CsA no inhibió este incremento tras 21 días, a pesar de que sí previno el desarrollo de la hipertrofia cardíaca. Un efecto similar de CsA ha sido descrito en otros modelos de hipertrofia inducidos por aldosterona o nefrectomía (Takeda et al., 2002, Di Marco et al., 2011). Estos resultados indicarían que el desarrollo de hipertensión mediado por AngII no está mediado por la ruta CN/NFAT, y de forma más importante, que en condiciones de alta presión arterial es posible bloquear la inducción de la patología hipertrófica. Nuestros resultados apoyan la idea de que AngII en situaciones patológicas, aparte de ser un factor clave en el desarrollo de la hipertensión, desencadena en el corazón una parte de la respuesta hipertrófica que es independiente de su efecto hipertensivo.

## ***Efectos de la delección de la CN cardiaca en el desarrollo de hipertrofia cardiaca en adultos***

Debido a los potenciales efectos secundarios y no específicos de la CsA, nos planteamos usar en paralelo otro abordaje para estudiar el papel de la CN en hipertrofia cardiaca que no implicara el uso de agentes farmacológicos y utilizamos una aproximación genética para la inhibición de CN. Existen en la bibliografía varios trabajos con modelos animales en los que la manipulación genética de diversos miembros de la ruta CN/NFAT da lugar a inducción o inhibición de hipertrofia. Por ejemplo, ratones con sobreexpresión de CN o NFATc4 constitutivamente activa en corazón presentan hipertrofia cardiaca revertida por el uso de CsA (Molkentin et al., 1998); ratones con delección de la isoforma  $\beta$  de la CnA son resistentes a la inducción de la enfermedad tras el tratamiento con agentes pro-hipertróficos como el isoproterenol o AngII (Bueno et al., 2002b); y ratones con delección de NFATc2 o NFATc3 muestran una respuesta reducida frente a estímulos hipertróficos (Bourajjaj et al., 2008, Wilkins et al., 2002). Todos estos modelos están basados en la sobreexpresión de genes de la ruta de forma constitutiva desde la etapa embrionaria o en su delección ubicua, lo que no parece un acercamiento apropiado para estudiar una enfermedad cardiaca que se produce durante la etapa adulta. Tras el desarrollo de los modelos de recombinasa Cre, se consiguió la delección selectiva de CN en músculo cardiaco (Maillet et al., 2010). Este se producía al estar la proteína Cre bajo el control del promotor del gen  $\alpha$ MHC, cuya expresión se activa en el momento del nacimiento de los roedores para sustituir a la isoforma fetal beta,  $\beta$ MHC. Pese al avance, la inhibición de CN se producía de forma perinatal, teniendo su efecto fuera del tiempo indicado para la enfermedad, y causaba una alta mortalidad debido a un desarrollo deficitario de los cardiomiocitos, que conllevaba arritmias cardiacas y eventualmente insuficiencia cardiaca, por lo que este modelo no era adecuado para estudiar el desarrollo de la hipertrofia cardiaca (Molkentin, 2013). Otro modelo genético que se ha descrito recientemente para analizar el papel de CN es un modelo del tipo *tet-off* (Berry et al., 2011), en el que los animales expresan CN constitutivamente activa de forma inducible al retirarles de la dieta doxiciclina, mientras que durante su administración los ratones tienen un nivel basal de expresión. Esto permitió a los investigadores, por un lado, restringir la sobreexpresión de CN en el corazón durante la etapa adulta, cuando se les retira el fármaco, y por otro, comprobar la reversibilidad de la patología al volver a administrárselo. Basándonos en todos estos modelos y en la falta de un buen modelo que nos permitiera restringir la ausencia de la CN cardiaca únicamente durante el desarrollo de la patología, nos decidimos a generar una línea de ratones usando un sistema de recombinasa Cre cardio-específico para eliminar el gen

de *Cnb1* y cuya actividad recombinasa es inducida por la administración de tamoxifeno (Sohal et al., 2001).

En efecto, tras sólo dos días después de finalizar la administración de tamoxifeno, obtuvimos una delección de CnB a nivel de ARNm y de proteína cercana al 60% en tejido cardíaco total, lo que supone una reducción casi total de CnB en los cardiomiocitos, ya que hay que tener en cuenta que el análisis se realizó en el órgano completo, donde coexisten estas células con otras como fibroblastos y células endoteliales. Tras el tratamiento con AngII durante 21 días, la ausencia de CN cardíaca confiere a los animales una clara resistencia a desarrollar hipertrofia cardíaca, inhibiéndose en este fondo genético la inducción de todos los parámetros patológicos inducidos por AngII, incluido el desarrollo de fibrosis, que no se inhibía en la aproximación farmacológica con CsA. Este dato revela que la CN del cardiomiocito es un mediador importante para la inducción de fibrosis en el miocardio. Dado que en el modelo farmacológico CsA no inhibía la aparición de fibrosis cardíaca, una hipótesis que surgió fue que CsA podría ejercer un efecto fibrótico aditivo con acciones fibróticas mediadas por AngII pero independientes de CN y esto produciría el mantenimiento de la fibrosis inducida por el tratamiento con AngII. Para comprobarlo, tratamos a los ratones con delección de CnB con CsA y AngII durante 21 días. Sorprendentemente, en este caso tampoco se indujo fibrosis en el miocardio, lo que invalidaba nuestra hipótesis. Por lo tanto, parece que la fibrosis inducida por AngII depende de la presencia de CN, y no de su actividad. Podría ocurrir que, dado que CN se halla asociada a las proteínas del disco Z en el sarcómero del cardiomiocito (Heineke et al., 2005, Jeong et al., 2008), tenga también una función como proteína de anclaje, y en situaciones de estrés su pérdida afecte a la organización del tejido cardíaco de tal forma que la respuesta fibrótica se vea bloqueada.

La ausencia de CN cardíaca en ratones control que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento no produjo efectos relevantes en ninguno de los parámetros analizados. Esto nos llevó a otra conclusión: en el punto final del experimento, estos animales se habían mantenido estables un mes sin actividad CN en el miocardio. Maillet et al (2010) observaron que los ratones con delección perinatal de *Cnb1* cardíaca presentaban una caída significativa de la función cardíaca, además de dilatación cardíaca en sístole, a partir del primer mes de vida, posiblemente debido a problemas en la proliferación de los cardiomiocitos. Nosotros no hemos encontrado este efecto en disfunción cardíaca en nuestro modelo, lo que nos lleva a sugerir que el papel de CN para la homeostasis del corazón varía a lo largo del desarrollo

perinatal y adulto, y la CN podría ejercer en el corazón funciones diferentes en las diferentes etapas de la vida.

Los ratones tratados con AngII presentaban hipertensión arterial tanto en el grupo control como en el tratado con Tx, y por tanto, independientemente de si los ratones tenían o no inhibido el desarrollo de hipertrofia cardiaca. Así, este resultado sostiene la idea ya expuesta de que AngII, en situaciones patológicas, provoca en el corazón una parte de la respuesta hipertrófica que es independiente de su efecto hipertensivo.

A pesar de que una de las consecuencias que puede tener la hipertrofia cardiaca es el desarrollo de una condición de insuficiencia cardiaca, no encontramos que la infusión con AngII provocara una caída de la fracción de eyección o del acortamiento fraccional, parámetros ecocardiográficos que expresan la funcionalidad del músculo cardiaco. Creemos que esto se debe a que el tratamiento dado en nuestro modelo es demasiado corto en el tiempo como para producir un descenso en la capacidad contráctil del corazón. De hecho, se ha mostrado recientemente en un modelo de hipertrofia cardiaca hipertensiva que los ratones sólo desarrollan disfunción sistólica tras 42 días con una combinación de infusión de AngII, dieta rica en sal y nefrectomía (Tsukamoto et al., 2013). Sería necesaria, por tanto, una exposición más larga a agentes hipertróficos más potentes que lo estudiado en nuestro modelo para elucidar el papel de la calcineurina en la insuficiencia cardiaca.

### ***El tratamiento único con CsA no induce alteraciones en el sistema cardiovascular***

Numerosas investigaciones experimentales y clínicas han descrito a CsA como un fármaco pro-hipertensivo, sin embargo en nuestro modelo no detectamos este efecto del inmunosupresor *per se* sobre la presión arterial. Los estudios clínicos existentes básicamente describen el tratamiento con CsA como la causa de la hipertensión que desarrollan los pacientes trasplantados y tratados con el inmunosupresor (Textor et al., 1994, Kaye et al., 1993, Roullet et al., 1994, Hoorn et al., 2012, Jardine, 2005, Miller, 2002, Ponticelli et al., 2011). Sin embargo, los trabajos con animales donde demuestran este efecto directo e hipertensivo de CsA realmente difieren en gran medida del nuestro, en cuanto a la vía de administración y dosis, lo que podría explicar estas diferencias (Zhang and Victor, 2000, Zhang et al., 2000). Lo mismo ocurre con la hipertensión, como hemos visto. Además, algunos trabajos han sugerido que el efecto hipertensivo de la CsA podría ser debido a que este fármaco provoca un aumento en la expresión de los receptores de AngII en la aorta (Avdonin

et al., 1999, Iwai et al., 1993), por lo que el aumento de presión arterial mediado por CsA sólo se produciría en situaciones donde estos receptores son susceptibles de ser activados, no en condiciones basales.

En nuestro modelo, CsA es incapaz de prevenir la inducción de fibrosis mediada por AngII y CsA, por sí sola, no produce fibrosis. Sin embargo, se ha descrito que el tratamiento con CsA produce fibrosis cardíaca (Kolar et al., 1996, Bianchi et al., 2003, Laczkovics et al., 1987, Khanna et al., 2002), aunque en estos estudios la duración del tratamiento y la dosis de CsA son mayores que en nuestro caso.

Los estudios sobre los efectos del tratamiento con CsA sobre la función cardíaca son contradictorios, se ha descrito que puede inducir disfunción sistólica en animales con sobrecarga de presión cardíaca (Meguro et al., 1999, Hiemstra et al., 2013) y en contraposición también se ha mostrado que el tratamiento con CsA no afecta a la función sistólica (Hill et al., 2000, Di Marco et al., 2011). Incluso, en animales con sobreexpresión de CN activa en corazón que desarrollan hipertrofia con disfunción cardíaca, se ha descrito que la CsA mejora la fracción de eyección en estos animales (Lim et al., 2000). En humanos, trasplantados renales con distinta duración de tratamiento inmunosupresor de CsA presentan disfunción diastólica con fracción de eyección preservada (Ofiaz et al., 2004). En nuestros primeros experimentos, los animales tratados únicamente con CsA o en combinación con AngII presentaron una reducción significativa de la fracción de eyección. Sin embargo, este resultado no fue reproducible en posteriores ensayos, tanto en ratones con genotipo silvestre como con delección de CN. En conjunto, aunque no hay una reducción significativa de la fracción de eyección, sí que los animales hipertróficos tratados con CsA presentan una cierta tendencia en desarrollar disfunción sistólica.

Una de posible explicación a la gran variabilidad de resultados en cuanto a fibrosis y función cardíaca podría ser la diferencia existente entre la dosis de CsA utilizadas en los diferentes estudios, que pueden variar entre 2 y 50mg/Kg/día (Hiemstra et al., 2013, Owunwanne et al., 1993). Sin embargo, nuestros resultados en un ensayo en el que sometimos a los ratones a un tratamiento con AngII y dosis crecientes de CsA, entre 0,5 y 12,5 mg/Kg/día, no detectamos diferencias significativas a ninguna de estas dosis función cardíaca tras 21 días con respecto a los ratones únicamente tratados con AngII.

## ***Activación de la ruta de TGF $\beta$ en las etapas tempranas del desarrollo de hipertrofia cardiaca***

Nuestros resultados muestran que el área celular, el grosor de las paredes ventriculares y la fibrosis resultan significativamente incrementados tras tres días de tratamiento con AngII. Esto indica que la hipertrofia cardiaca es una respuesta que se produce rápidamente tras este estímulo, y sugiere la posibilidad de que AngII active un programa génico que desencadene esta respuesta tan rápida.

Una de las rutas de señalización que ha sido descrita como clave en el desarrollo de la fibrosis cardiaca es la del TGF $\beta$  (Creemers and Pinto, 2011, Ruiz-Ortega et al., 2007). AngII es capaz de activar la expresión de TGF $\beta$  y CTGF en el corazón (Lim and Zhu, 2006, Leask, 2007), por lo que decidimos comprobar si esta activación ocurría a tiempos tempranos y si era dependiente de CN/NFAT. La expresión de dos miembros de la ruta de TGF $\beta$ , TGF $\beta$ 1 y CTGF, se indujo en corazón tras 24 h de tratamiento con AngII. CsA no inhibe este incremento, mientras que la delección de CnB produce una reducción significativa de la expresión de estos genes. Dado que tanto TGF $\beta$  como CTGF son mediadores en el desarrollo de fibrosis, las diferencias en la expresión de estos genes entre los dos tipos de inhibición de la ruta podrían explicar las diferencias en el patrón de fibrosis en ambos modelos.

Una posible explicación complementaria y/o alternativa a los resultados encontrados sobre la inducción de fibrosis era que hubiese una regulación transcripcional diferencial de los tipos de colágeno *per se* que dan cuenta de la fibrosis entre ambos modelos. En consonancia con estudios previos, el tratamiento con AngII eleva la expresión de Col1a1 y Col3, y corroborando nuestros datos histológicos la CsA no es capaz de inhibir este aumento provocado por AngII, incluso incrementa los niveles de expresión. Cabía la posibilidad, por tanto, de que los animales con delección de CN y tratados con AngII, al presentar una respuesta fibrótica reducida, tuvieran también una reducida expresión de ambos genes. Sin embargo, la ausencia de CN no alteró en gran medida el patrón de expresión de Col1 y Col3 inducido por AngII. Los resultados de expresión génica sugieren que la CN cardiaca no estaría implicada en la inducción transcripcional de estos colágenos mediada por AngII. Aunque aún no hemos corroborado nuestros datos histológicos de fibrosis con ensayos que determinen los niveles proteicos de colágeno I y III en nuestras dos aproximaciones experimentales, la presencia de CN podría estar regulando post-transcripcionalmente la expresión de estos genes interviniendo en los mecanismos de traducción, degradación o deposición en la matriz



extracelular de estas proteínas. Por ejemplo, la falta de CN en el cardiomiocito podría desregular algún mecanismo que “protege” la traducción de los colágenos y por tanto reducir su presencia en la matriz extracelular sin que la expresión a nivel de mensajero se viera alterada. En cualquier caso, los distintos mecanismos de regulación post-transcripcional de los colágenos merecen un estudio aparte y completo para elucidar el papel de la CN en la producción de colágenos de matriz y en fibrosis cardíaca.

### ***Terapia génica cardíaca frente a la activación de calcineurina***

En nuestro laboratorio, varios proyectos han pivotado alrededor del uso del péptido inhibidor de CN LxVP como herramienta terapéutica en enfermedades donde la ruta de CN/NFAT juega un papel relevante, patologías con un claro componente inflamatorio como la artritis reumatoide o sobre enfermedades que cursan con remodelado vascular como el aneurisma abdominal aórtico y la aterosclerosis. Dada la importancia de la CN en el desarrollo de hipertrofia cardíaca, nos planteamos el uso de este péptido como herramienta terapéutica frente a la enfermedad.

En un primer abordaje, usamos vectores lentivirales para expresar el péptido LxVP. El fracaso en obtener una inhibición de la ruta CN/NFAT mediante esta aproximación tendría dos explicaciones. Primero, la baja potencia de la región promotora  $\alpha$ MHC empleada, que impedía una expresión suficiente del LxVP, y segundo, la dificultad para infectar el miocardio con este tipo de vector. Una solución para el primer problema sería usar otro promotor más potente, como el de la troponina, que ha dado buenos resultados de especificidad de transducción en otros trabajos (Ma et al., 2004, Iannello et al., 1991, Werfel et al., 2014, Prasad et al., 2011). Sin embargo, la muerte detectada en cardiomiocitos adultos de ratón infectados con nuestros lentivirus revela un problema independiente de la potencia del promotor a la hora de analizar los efectos de la expresión del péptido en estudios *in vitro* con cardiomiocitos adultos aislados, su susceptibilidad a la muerte. En cuanto a la solución para el segundo inconveniente detectado en las aproximaciones *in vivo*, sería necesario buscar una forma alternativa de administración del lentivirus que infectara eficientemente el miocardio. A este respecto, en la bibliografía hay pocos trabajos en los que se usen lentivirus para infectar el miocardio (Nolly et al., 2014, Di Pasquale et al., 2012, Barth et al., 2008), y en los que se emplea los lentivirus se administran por inyección directa en el músculo cardíaco. Sin embargo, esta vía de administración no parece muy eficaz para bloquear una patología cardíaca que afecta al miocardio de forma general como es la hipertrofia, ya que es muy probable que se obtenga únicamente una transducción local del transgén en el lugar del pinchazo (Ly et al., 2008). Hasta

hace menos de una década, la mayoría de trabajos sobre terapia génica cardíaca se basaban en el uso de adenovirus, inicialmente inyectados en el miocardio, o posteriormente administrados por vía intracardiaca con oclusión de la aorta para permitir la recirculación por las coronarias y producir una infección homogénea del miocardio (Hajjar et al., 1998). Sin embargo, esta aproximación adenoviral, aparte de la complejidad técnica que conlleva su administración, presenta otras desventajas como su alta inmunogenicidad y una transducción temporal del tejido (Katz et al., 2013).

La llegada de la tecnología de vectores basados en los virus adeno-asociados (AAV) revolucionó el campo de la terapia génica cardíaca. Los AAV tienen varias ventajas sobre otros vectores virales: infectan células que no se dividen, como las musculares; se trata de un patógeno humano que no produce enfermedades conocidas, lo que conlleva una alta bioseguridad en su manejo; son poco inmunogénicos; y forman en el interior de las células infectadas episomas estables que aseguran una expresión mantenida en el tiempo (Ly et al., 2008). Otra ventaja que los hace atractivos para su uso en terapia génica es que los AAV tienen diferentes serotipos con distintos tropismos, que permiten una administración intravenosa minimizando el escape del virus a otros tejidos. El serotipo 9 es el de mayor tropismo cardíaco (Inagaki et al., 2006, Prasad et al., 2011), y se usa habitualmente en terapia génica cardíaca. Por ejemplo, en modelos de ratón, se usan dosis de AAV9 entre  $10^{11}$  y  $5 \times 10^{11}$  vg consiguiendo buenos niveles de infección en el corazón (Piras et al., 2013, Konkalmatt et al., 2013, Larocca et al., 2012). También están siendo utilizados en ensayos clínicos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Hajjar et al., 2008, Gwathmey et al., 2011, Smith et al., 2013). De hecho, en 2012 la Unión Europea aprobó por vez primera la comercialización de un tratamiento de terapia génica, que consiste en un AAV de serotipo 1, para la deficiencia en lipoproteína lipasa, bajo el nombre comercial *Glybera* (Yla-Herttuala, 2012).

Todo esto nos llevó a usar este abordaje con AAV en nuestro modelo, obteniendo una alta transducción *in vivo* de nuestro transgén tras administración intravenosa. Sin embargo, usando este sistema no fuimos capaces de conseguir la inhibición *in vivo* de la ruta CN/NFAT cuando era activada por AngII. Dada la eficacia demostrada del péptido LxVP para bloquear de la actividad CN en otros modelos *in vivo*, creemos que la causa de no obtener una inhibición suficientemente eficaz en el corazón podría estar relacionada con problemas de accesibilidad a la CN en los cardiomiocitos. De hecho, CN parece ocupar una localización subcelular altamente definida en los cardiomiocitos que le permitiría ser sensible a las variaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  relacionados con la expresión génica pero le aislaría de los flujos propios de la excitación-

contracción. Concretamente, se ha postulado que CN estaría unida a la proteína caveolina 3 (Cav3) en balsas lipídicas (Makarewich et al., 2012), a canales de calcio de tipo L (LTCC), a la proteína muscular LIM en los discos Z (Heineke et al., 2005, Jeong et al., 2008) y a la bomba de calcio de membrana plasmática (PMCA) (Wu et al., 2009, Buch et al., 2005, Houser and Molkentin, 2008). Es posible que la especial localización de la CN en el cardiomiocito impida a la proteína de fusión GFP-LxVP que se expresa tras la infección acceder al lugar donde se halla la CN, necesitando una mayor transducción de la célula. Sin embargo, una expresión demasiado elevada de GFP en las células podría dar efectos tóxicos indeseados, ya que existen indicios sobre la inmunogenicidad del GFP al ser sobreexpresado en tratamientos de terapia génica (Stripecke et al., 1999, Rosenzweig et al., 2001, Badrian and Bogoyevitch, 2007). Por todo ello, hemos decidido no seguir usando el sistema AAV-LxVP como agente terapéutico en hipertrofia cardíaca.



## CONCLUSIONES



En este trabajo se ha descrito el papel de la CN en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca patológica mediada por AngII. De los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La estimulación con AngII induce la activación de la calcineurina en el corazón y el desarrollo de un fenotipo hipertrófico a tiempos tempranos.
2. La inhibición farmacológica y la deficiencia genética de CN reducen el desarrollo de la hipertrofia cardiaca.
3. La fibrosis cardiaca inducida por AngII se inhibe en ratones con cardiomiocitos deficientes en CN; sin embargo este efecto no se produce con la inhibición por CsA.
4. La inhibición farmacológica de CN por CsA y la delección genética de CN afectan de forma diferencial a la expresión de genes profibróticos que AngII induce en corazón.
5. El tratamiento con CsA o la delección genética de CN previenen la hipertrofia sin modificar los efectos hipertensivos de AngII, por lo que la hipertensión arterial no está asociada a la hipertrofia cardiaca inducida por AngII.
6. La función sistólica del corazón se preserva tanto cuando CN se inhibe con CsA como en ratones deficientes en CN cardiaca.
7. Pese a la eficiencia de la infección del miocardio con vectores virales AAV9 que expresan el péptido inhibidor LxVP, este no inhibe la activación de la ruta CN/NFAT en el corazón.





## BIBLIOGRAFÍA



- ABASSI, Z. A., PIERUZZI, F., NAKHOUL, F. & KEISER, H. R. 1996. Effects of cyclosporin A on the synthesis, excretion, and metabolism of endothelin in the rat. *Hypertension*, 27, 1140-8.
- ABBASI, S., SU, B., KELLEMS, R. E., YANG, J. & XIA, Y. 2005. The essential role of MEKK3 signaling in angiotensin II-induced calcineurin/nuclear factor of activated T-cells activation. *The Journal of biological chemistry*, 280, 36737-46.
- ANDERSON, R. H., RAZAVI, R. & TAYLOR, A. M. 2004. Cardiac anatomy revisited. *Journal of anatomy*, 205, 159-77.
- ARAMBURU, J., GARCIA-COZAR, F., RAGHAVAN, A., OKAMURA, H., RAO, A. & HOGAN, P. G. 1998. Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Molecular cell*, 1, 627-37.
- ARAMBURU, J., YAFFE, M. B., LOPEZ-RODRIGUEZ, C., CANTLEY, L. C., HOGAN, P. G. & RAO, A. 1999. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science*, 285, 2129-33.
- AVDONIN, P. V., COTTET-MAIRE, F., AFANASJEVA, G. V., LOKTIONOVA, S. A., LHOTE, P. & RUEGG, U. T. 1999. Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney international*, 55, 2407-14.
- AZZI, J. R., SAYEGH, M. H. & MALLAT, S. G. 2013. Calcineurin inhibitors: 40 years later, can't live without. *Journal of immunology*, 191, 5785-91.
- BADRIAN, B. & BOGOYEVITCH, M. A. 2007. Changes in the transcriptional profile of cardiac myocytes following green fluorescent protein expression. *DNA and cell biology*, 26, 727-36.
- BALAKUMAR, P. & JAGADEESH, G. 2014. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cellular signalling*, 26, 2147-60.
- BARTH, A. S., KIZANA, E., SMITH, R. R., TERROVITIS, J., DONG, P., LEPPA, M. K., ZHANG, Y., MIAKE, J., OLSON, E. N., SCHNEIDER, J. W., ABRAHAM, M. R. & MARBAN, E. 2008. Lentiviral vectors bearing the cardiac promoter of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger report cardiogenic differentiation in stem cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16, 957-64.
- BERRY, J. M., LE, V., ROTTER, D., BATTIPROLU, P. K., GRINSFELDER, B., TANNOUS, P., BURCHFIELD, J. S., CZUBRYT, M., BACKS, J., OLSON, E. N., ROTHERMEL, B. A. & HILL, J. A. 2011. Reversibility of adverse, calcineurin-dependent cardiac remodeling. *Circulation research*, 109, 407-17.
- BIANCHI, R., RODELLA, L. & REZZANI, R. 2003. Cyclosporine A up-regulates expression of matrix metalloproteinase 2 and vascular endothelial growth factor in rat heart. *International immunopharmacology*, 3, 427-33.
- BOBADILLA, N. A. & GAMBA, G. 2007. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. *American journal of physiology. Renal physiology*, 293, F2-9.
- BOREL, J. F., FEURER, C., GUBLER, H. U. & STAHELIN, H. 1976. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and actions*, 6, 468-75.
- BOURAJAJ, M., ARMAND, A. S., DA COSTA MARTINS, P. A., WEIJTS, B., VAN DER NAGEL, R., HEENEMAN, S., WEHRENS, X. H. & DE WINDT, L. J. 2008. NFATc2 is a necessary mediator of calcineurin-dependent cardiac hypertrophy and heart failure. *The Journal of biological chemistry*, 283, 22295-303.

- BRILLA, C. G., RUPP, H., FUNCK, R. & MAISCH, B. 1995. The renin-angiotensin-aldosterone system and myocardial collagen matrix remodelling in congestive heart failure. *European heart journal*, 16 Suppl O, 107-9.
- BRUCKSCHLEGEL, G., HOLMER, S. R., JANDELEIT, K., GRIMM, D., MUDERS, F., KROMER, E. P., RIEGGER, G. A. & SCHUNKERT, H. 1995. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension*, 25, 250-9.
- BUCH, M. H., PICKARD, A., RODRIGUEZ, A., GILLIES, S., MAASS, A. H., EMERSON, M., CARTWRIGHT, E. J., WILLIAMS, J. C., OCEANDY, D., REDONDO, J. M., NEYSES, L. & ARMESILLA, A. L. 2005. The sarcolemmal calcium pump inhibits the calcineurin/nuclear factor of activated T-cell pathway via interaction with the calcineurin A catalytic subunit. *The Journal of biological chemistry*, 280, 29479-87.
- BUENO, O. F., VAN ROOIJ, E., MOLKENTIN, J. D., DOEVENDANS, P. A. & DE WINDT, L. J. 2002a. Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovascular research*, 53, 806-21.
- BUENO, O. F., WILKINS, B. J., TYMITZ, K. M., GLASCOCK, B. J., KIMBALL, T. F., LORENZ, J. N. & MOLKENTIN, J. D. 2002b. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 4586-91.
- BUFFOLI, B., PECHANOVA, O., KOJSOVA, S., ANDRIANTSITOHAINA, R., GIUGNO, L., BIANCHI, R. & REZZANI, R. 2005. Proviron prevents CsA-induced nephrotoxicity by reducing reactive oxygen species, iNOS, and NF-kB expression. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 53, 1459-68.
- CANTE-BARRETT, K., WINSLOW, M. M. & CRABTREE, G. R. 2007. Selective role of NFATc3 in positive selection of thymocytes. *Journal of immunology*, 179, 103-10.
- CEREGHETTI, G. M., STANGHERLIN, A., MARTINS DE BRITO, O., CHANG, C. R., BLACKSTONE, C., BERNARDI, P. & SCORRANO, L. 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 15803-8.
- CLERK, A., CULLINGFORD, T. E., FULLER, S. J., GIRALDO, A., MARKOU, T., PIKKARAINEN, S. & SUGDEN, P. H. 2007. Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses. *Journal of cellular physiology*, 212, 311-22.
- COLELLA, M., GRISAN, F., ROBERT, V., TURNER, J. D., THOMAS, A. P. & POZZAN, T. 2008. Ca<sup>2+</sup> oscillation frequency decoding in cardiac cell hypertrophy: role of calcineurin/NFAT as Ca<sup>2+</sup> signal integrators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 2859-64.
- CRABTREE, G. R. & OLSON, E. N. 2002. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell*, 109 Suppl, S67-79.
- CRABTREE, G. R. & SCHREIBER, S. L. 2009. SnapShot: Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signaling. *Cell*, 138, 210, 210 e1.
- CREEMERS, E. E. & PINTO, Y. M. 2011. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart. *Cardiovascular research*, 89, 265-72.
- DAUGHERTY, A., MANNING, M. W. & CASSIS, L. A. 2000. Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*, 105, 1605-12.
- DAWSON, T. M., STEINER, J. P., DAWSON, V. L., DINERMAN, J. L., UHL, G. R. & SNYDER, S. H. 1993. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 9808-12.
- DE WINDT, L. J., LIM, H. W., BUENO, O. F., LIANG, Q., DELLING, U., BRAZ, J. C., GLASCOCK, B. J., KIMBALL, T. F., DEL MONTE, F., HAJJAR, R. J. & MOLKENTIN, J. D. 2001. Targeted

- inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3322-7.
- DECKER, E. L., SKERKA, C. & ZIPFEL, P. F. 1998. The early growth response protein (EGR-1) regulates interleukin-2 transcription by synergistic interaction with the nuclear factor of activated T cells. *The Journal of biological chemistry*, 273, 26923-30.
- DI MARCO, G. S., RUSTEMEYER, P., BRAND, M., KOCH, R., KENTRUP, D., GRABNER, A., GREVE, B., WITTKOWSKI, W., PAVENSTADT, H., HAUSBERG, M., REUTER, S. & LANG, D. 2011. Circulating endothelial progenitor cells in kidney transplant patients. *PloS one*, 6, e24046.
- DI PASQUALE, E., LATRONICO, M. V., JOTTI, G. S. & CONDORELLI, G. 2012. Lentiviral vectors and cardiovascular diseases: a genetic tool for manipulating cardiomyocyte differentiation and function. *Gene therapy*, 19, 642-8.
- DING, B., PRICE, R. L., BORG, T. K., WEINBERG, E. O., HALLORAN, P. F. & LORELL, B. H. 1999. Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circulation research*, 84, 729-34.
- DINI, F. L., GUARINI, G., BALLO, P., CARLUCCIO, E., MAIELLO, M., CAPOZZA, P., INNELLI, P., ROSA, G. M., PALMIERO, P., GALDERISI, M., RAZZOLINI, R. & NODARI, S. 2013. The left ventricle as a mechanical engine: from Leonardo da Vinci to the echocardiographic assessment of peak power output-to-left ventricular mass. *Journal of cardiovascular medicine*, 14, 214-20.
- DOLMETSCH, R. E., LEWIS, R. S., GOODNOW, C. C. & HEALY, J. I. 1997. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*, 386, 855-8.
- EDER, P. & MOLKENTIN, J. D. 2011. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circulation research*, 108, 265-72.
- EKBERG, H., TEDESCO-SILVA, H., DEMIRBAS, A., VITKO, S., NASHAN, B., GURKAN, A., MARGREITER, R., HUGO, C., GRINYO, J. M., FREI, U., VANRENTERGHEM, Y., DALOZE, P. & HALLORAN, P. F. 2007. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *The New England journal of medicine*, 357, 2562-75.
- ESCOLANO, A., MARTINEZ-MARTINEZ, S., ALFRANCA, A., URSO, K., IZQUIERDO, H. M., DELGADO, M., MARTIN, F., SABIO, G., SANCHO, D., GOMEZ-DEL ARCO, P. & REDONDO, J. M. 2014. Specific calcineurin targeting in macrophages confers resistance to inflammation via MKP-1 and p38. *The EMBO journal*, 33, 1117-33.
- ESTEBAN, V., MENDEZ-BARBERO, N., JIMENEZ-BORREGUERO, L. J., ROQUE, M., NOVENSA, L., GARCIA-REDONDO, A. B., SALAICES, M., VILA, L., ARBONES, M. L., CAMPANERO, M. R. & REDONDO, J. M. 2011. Regulator of calcineurin 1 mediates pathological vascular wall remodeling. *The Journal of experimental medicine*, 208, 2125-39.
- FINCKENBERG, P., ERIKSSON, O., BAUMANN, M., MERASTO, S., LALOWSKI, M. M., LEVIJOKI, J., HAASIO, K., KYTO, V., MULLER, D. N., LUFT, F. C., ORESIC, M. & MERVAALA, E. 2012. Caloric restriction ameliorates angiotensin II-induced mitochondrial remodeling and cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 59, 76-84.
- FRANK, D., KUHN, C., BRORS, B., HANSELMANN, C., LUDDE, M., KATUS, H. A. & FREY, N. 2008. Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension*, 51, 309-18.
- FREUND, C., SCHMIDT-ULLRICH, R., BAURAND, A., DUNGER, S., SCHNEIDER, W., LOSER, P., EL-JAMALI, A., DIETZ, R., SCHEIDEREIT, C. & BERGMANN, M. W. 2005. Requirement of nuclear factor-kappaB in angiotensin II- and isoproterenol-induced cardiac hypertrophy in vivo. *Circulation*, 111, 2319-25.
- GIFFIN, M. J., STROUD, J. C., BATES, D. L., VON KOENIG, K. D., HARDIN, J. & CHEN, L. 2003. Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nature structural biology*, 10, 800-6.

- GOLDSPINK, P. H., MCKINNEY, R. D., KIMBALL, V. A., GEENEN, D. L. & BUTTRICK, P. M. 2001. Angiotensin II induced cardiac hypertrophy in vivo is inhibited by cyclosporin A in adult rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 226, 83-8.
- GOMEZ, A. M., RUIZ-HURTADO, G., BENITAH, J. P. & DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, A. 2013. Ca(2+) fluxes involvement in gene expression during cardiac hypertrophy. *Current vascular pharmacology*, 11, 497-506.
- GOMEZ DEL ARCO, P., MARTINEZ-MARTINEZ, S., MALDONADO, J. L., ORTEGA-PEREZ, I. & REDONDO, J. M. 2000. A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *The Journal of biological chemistry*, 275, 13872-8.
- GOTO, S., YAMAMOTO, H., FUKUNAGA, K., IWASA, T., MATSUKADO, Y. & MIYAMOTO, E. 1985. Dephosphorylation of microtubule-associated protein 2, tau factor, and tubulin by calcineurin. *Journal of neurochemistry*, 45, 276-83.
- GRAEF, I. A., CHEN, F. & CRABTREE, G. R. 2001a. NFAT signaling in vertebrate development. *Current opinion in genetics & development*, 11, 505-12.
- GRAEF, I. A., CHEN, F., CHEN, L., KUO, A. & CRABTREE, G. R. 2001b. Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*, 105, 863-75.
- GREENE, E. L., LU, G., ZHANG, D. & EGAN, B. M. 2001. Signaling events mediating the additive effects of oleic acid and angiotensin II on vascular smooth muscle cell migration. *Hypertension*, 37, 308-12.
- GRIGORIU, S., BOND, R., COSSIO, P., CHEN, J. A., LY, N., HUMMER, G., PAGE, R., CYERT, M. S. & PETI, W. 2013. The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. *PLoS biology*, 11, e1001492.
- GWATHMEY, J. K., YEREVANIAN, A. I. & HAJJAR, R. J. 2011. Cardiac gene therapy with SERCA2a: from bench to bedside. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 50, 803-12.
- HAJJAR, R. J., SCHMIDT, U., MATSUI, T., GUERRERO, J. L., LEE, K. H., GWATHMEY, J. K., DEC, G. W., SEMIGRAN, M. J. & ROSENZWEIG, A. 1998. Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 5251-6.
- HAJJAR, R. J., ZSEBO, K., DECKELBAUM, L., THOMPSON, C., RUDY, J., YAROSHINSKY, A., LY, H., KAWASE, Y., WAGNER, K., BOROW, K., JASKI, B., LONDON, B., GREENBERG, B., PAULY, D. F., PATTEN, R., STARLING, R., MANCINI, D. & JESSUP, M. 2008. Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure. *Journal of cardiac failure*, 14, 355-67.
- HEINEKE, J. & MOLKENTIN, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7, 589-600.
- HEINEKE, J. & RITTER, O. 2012. Cardiomyocyte calcineurin signaling in subcellular domains: from the sarcolemma to the nucleus and beyond. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52, 62-73.
- HEINEKE, J., RUETTEN, H., WILLENBOCKEL, C., GROSS, S. C., NAGUIB, M., SCHAEFER, A., KEMPF, T., HILFIKER-KLEINER, D., CARONI, P., KRAFT, T., KAISER, R. A., MOLKENTIN, J. D., DREXLER, H. & WOLLERT, K. C. 2005. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 1655-60.
- HEIT, J. J. 2007. Calcineurin/NFAT signaling in the beta-cell: From diabetes to new therapeutics. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 29, 1011-21.
- HIEMSTRA, J. A., LIU, S., AHLMAN, M. A., SCHULERI, K. H., LARDO, A. C., BAINES, C. P., DELLSPERGER, K. C., BLUEMKE, D. A. & EMTER, C. A. 2013. A new twist on an old idea: a two-dimensional speckle tracking assessment of cyclosporine as a therapeutic

- alternative for heart failure with preserved ejection fraction. *Physiological reports*, 1, e00174.
- HILL, J. A., KARIMI, M., KUTSCHKE, W., DAVISSON, R. L., ZIMMERMAN, K., WANG, Z., KERBER, R. E. & WEISS, R. M. 2000. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation*, 101, 2863-9.
- HILL, J. A. & OLSON, E. N. 2008. Cardiac plasticity. *The New England journal of medicine*, 358, 1370-80.
- HODGE, M. R., RANGER, A. M., CHARLES DE LA BROUSSE, F., HOEY, T., GRUSBY, M. J. & GLIMCHER, L. H. 1996. Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity*, 4, 397-405.
- HOGAN, P. G., CHEN, L., NARDONE, J. & RAO, A. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & development*, 17, 2205-32.
- HOJO, M., MORIMOTO, T., MALUCCIO, M., ASANO, T., MORIMOTO, K., LAGMAN, M., SHIMBO, T. & SUTHANTHIRAN, M. 1999. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature*, 397, 530-4.
- HOORN, E. J., WALSH, S. B., MCCORMICK, J. A., ZIETSE, R., UNWIN, R. J. & ELLISON, D. H. 2012. Pathogenesis of calcineurin inhibitor-induced hypertension. *Journal of nephrology*, 25, 269-75.
- HOUSER, S. R., MARGULIES, K. B., MURPHY, A. M., SPINALE, F. G., FRANCIS, G. S., PRABHU, S. D., ROCKMAN, H. A., KASS, D. A., MOLKENTIN, J. D., SUSSMAN, M. A. & KOCH, W. J. 2012. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research*, 111, 131-50.
- HOUSER, S. R. & MOLKENTIN, J. D. 2008. Does contractile Ca<sup>2+</sup> control calcineurin-NFAT signaling and pathological hypertrophy in cardiac myocytes? *Science signaling*, 1, pe31.
- HUAI, Q., KIM, H. Y., LIU, Y., ZHAO, Y., MONDRAGON, A., LIU, J. O. & KE, H. 2002. Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 12037-42.
- IANNELLO, R. C., MAR, J. H. & ORDAHL, C. P. 1991. Characterization of a promoter element required for transcription in myocardial cells. *The Journal of biological chemistry*, 266, 3309-16.
- INAGAKI, K., FUESS, S., STORM, T. A., GIBSON, G. A., MCTIERNAN, C. F., KAY, M. A. & NAKAI, H. 2006. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 14, 45-53.
- ISSA, N., KUKLA, A. & IBRAHIM, H. N. 2013. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence. *American journal of nephrology*, 37, 602-12.
- IWAI, J., KANAYAMA, Y., NEGORO, N., INOUE, T., OKAMURA, M. & TAKEDA, T. 1993. Increased gene expression of angiotensin II type 1A receptor in aortic smooth muscle cells of cyclosporin A-induced hypertensive rats. *Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*, 11, S122-3.
- JARDINE, A. G. 2005. Assessing the relative risk of cardiovascular disease among renal transplant patients receiving tacrolimus or cyclosporine. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 18, 379-84.
- JEONG, D., KIM, J. M., CHA, H., OH, J. G., PARK, J., YUN, S. H., JU, E. S., JEON, E. S., HAJJAR, R. J. & PARK, W. J. 2008. PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circulation research*, 102, 711-9.
- KANNEL, W. B. 2000. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart failure reviews*, 5, 167-73.

- KASHISHIAN, A., HOWARD, M., LOH, C., GALLATIN, W. M., HOEKSTRA, M. F. & LAI, Y. 1998. AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *The Journal of biological chemistry*, 273, 27412-9.
- KATO, H., SUZUKI, H., TAJIMA, S., OGATA, Y., TOMINAGA, T., SATO, A. & SARUTA, T. 1991. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of hypertension*, 9, 17-22.
- KATZ, M. G., FARGNOLI, A. S., WILLIAMS, R. D. & BRIDGES, C. R. 2013. Gene therapy delivery systems for enhancing viral and nonviral vectors for cardiac diseases: current concepts and future applications. *Human gene therapy*, 24, 914-27.
- KAYE, D., THOMPSON, J., JENNINGS, G. & ESLER, M. 1993. Cyclosporine therapy after cardiac transplantation causes hypertension and renal vasoconstriction without sympathetic activation. *Circulation*, 88, 1101-9.
- KHANNA, A., LI, B., STENZEL, K. H. & SUTHANTHIRAN, M. 1994. Regulation of new DNA synthesis in mammalian cells by cyclosporine. Demonstration of a transforming growth factor beta-dependent mechanism of inhibition of cell growth. *Transplantation*, 57, 577-82.
- KHANNA, A. K., HOSENPUD, J. S., PLUMMER, M. S. & HOSENPUD, J. D. 2002. Analysis of transforming growth factor-beta and profibrogenic molecules in a rat cardiac allograft model treated with cyclosporine. *Transplantation*, 73, 1543-9.
- KIANI, A., RAO, A. & ARAMBURU, J. 2000. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity*, 12, 359-72.
- KIM, S. & IWAHO, H. 2000. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological reviews*, 52, 11-34.
- KLEE, C. B., CROUCH, T. H. & KRINKS, M. H. 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 6270-3.
- KLEE, C. B., REN, H. & WANG, X. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *The Journal of biological chemistry*, 273, 13367-70.
- KOLAR, F., PAPOUSEK, F., MACNAUGHTON, C., PELOUCH, V., MILEROVA, M. & KORECKY, B. 1996. Myocardial fibrosis and right ventricular function of heterotopically transplanted hearts in rats treated with cyclosporin. *Molecular and cellular biochemistry*, 163-164, 253-60.
- KOLATA, G. 1983. Drug transforms transplant medicine. *Science*, 221, 40-2.
- KONKALMATT, P. R., BEYERS, R. J., O'CONNOR, D. M., XU, Y., SEAMAN, M. E. & FRENCH, B. A. 2013. Cardiac-selective expression of extracellular superoxide dismutase after systemic injection of adeno-associated virus 9 protects the heart against post-myocardial infarction left ventricular remodeling. *Circulation. Cardiovascular imaging*, 6, 478-86.
- KURDI, M. & BOOZ, G. W. 2011. New take on the role of angiotensin II in cardiac hypertrophy and fibrosis. *Hypertension*, 57, 1034-8.
- KUWAHARA, K., WANG, Y., MCANALLY, J., RICHARDSON, J. A., BASSEL-DUBY, R., HILL, J. A. & OLSON, E. N. 2006. TRPC6 fulfills a calcineurin signaling circuit during pathologic cardiac remodeling. *The Journal of clinical investigation*, 116, 3114-26.
- LACZKOVICS, A., HAVEL, M., TEUFELSBAUER, H., HORVATH, R., SCHREINER, W. & WOLNER, E. 1987. Cyclosporin-A induced heart failure after orthotopic heart transplantation. *The Thoracic and cardiovascular surgeon*, 35, 83-6.
- LARKIN, J. E., FRANK, B. C., GASPARD, R. M., DUKA, I., GAVRAS, H. & QUACKENBUSH, J. 2004. Cardiac transcriptional response to acute and chronic angiotensin II treatments. *Physiological genomics*, 18, 152-66.
- LAROCCA, T. J., JEONG, D., KOHLBRENNER, E., LEE, A., CHEN, J., HAJJAR, R. J. & TARZAMI, S. T. 2012. CXCR4 gene transfer prevents pressure overload induced heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 53, 223-32.



- LAUDI, S., WEIMANN, J., HASCHKE, M., TRUMP, S., SCHMITZ, V., CHRISTIANS, U., KAISERS, U. & STEUDEL, W. 2007. Worsening of long-term myocardial function after successful pharmacological pretreatment with cyclosporine. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 58, 19-32.
- LEASK, A. 2007. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovascular research*, 74, 207-12.
- LEVY, D., GARRISON, R. J., SAVAGE, D. D., KANNEL, W. B. & CASTELLI, W. P. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England journal of medicine*, 322, 1561-6.
- LI, H., PINK, M. D., MURPHY, J. G., STEIN, A., DELL'ACQUA, M. L. & HOGAN, P. G. 2012. Balanced interactions of calcineurin with AKAP79 regulate Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signaling. *Nature structural & molecular biology*, 19, 337-45.
- LI, H., RAO, A. & HOGAN, P. G. 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in cell biology*, 21, 91-103.
- LI, H., ZHANG, L., RAO, A., HARRISON, S. C. & HOGAN, P. G. 2007. Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signalling interaction. *Journal of molecular biology*, 369, 1296-306.
- LIM, H. & ZHU, Y. Z. 2006. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63, 2584-96.
- LIM, H. W., DE WINDT, L. J., MANTE, J., KIMBALL, T. R., WITT, S. A., SUSSMAN, M. A. & MOKKENTIN, J. D. 2000. Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 32, 697-709.
- LIN, X., SIKKINK, R. A., RUSNAK, F. & BARBER, D. L. 1999. Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *The Journal of biological chemistry*, 274, 36125-31.
- LIU, J., ARAI, K. & ARAI, N. 2001. Inhibition of NFATx activation by an oligopeptide: disrupting the interaction of NFATx with calcineurin. *Journal of immunology*, 167, 2677-87.
- LUNDE, I. G., KVALOY, H., AUSTBO, B., CHRISTENSEN, G. & CARLSON, C. R. 2011. Angiotensin II and norepinephrine activate specific calcineurin-dependent NFAT transcription factor isoforms in cardiomyocytes. *Journal of applied physiology*, 111, 1278-89.
- LY, H. Q., KAWASE, Y. & HAJJAR, R. J. 2008. Advances in gene-based therapy for heart failure. *Journal of cardiovascular translational research*, 1, 127-36.
- MA, H., SUMBILLA, C. M., FARRANCE, I. K., KLEIN, M. G. & INESI, G. 2004. Cell-specific expression of SERCA, the exogenous Ca<sup>2+</sup> transport ATPase, in cardiac myocytes. *American journal of physiology. Cell physiology*, 286, C556-64.
- MACIAN, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nature reviews. Immunology*, 5, 472-84.
- MAILLET, M., DAVIS, J., AUGER-MESSIER, M., YORK, A., OSINSKA, H., PIQUEREAU, J., LORENZ, J. N., ROBBINS, J., VENTURA-CLAPIER, R. & MOKKENTIN, J. D. 2010. Heart-specific deletion of CnB1 reveals multiple mechanisms whereby calcineurin regulates cardiac growth and function. *The Journal of biological chemistry*, 285, 6716-24.
- MAILLET, M., VAN BERLO, J. H. & MOKKENTIN, J. D. 2013. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14, 38-48.
- MAKAREWICH, C. A., CORRELL, R. N., GAO, H., ZHANG, H., YANG, B., BERRETTA, R. M., RIZZO, V., MOKKENTIN, J. D. & HOUSER, S. R. 2012. A caveolae-targeted L-type Ca(2)<sup>+</sup> channel antagonist inhibits hypertrophic signaling without reducing cardiac contractility. *Circulation research*, 110, 669-74.
- MARTINEZ-MARTINEZ, S. & REDONDO, J. M. 2004. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Current medicinal chemistry*, 11, 997-1007.

- MARTINEZ-MARTINEZ, S., RODRIGUEZ, A., LOPEZ-MADERUELO, M. D., ORTEGA-PEREZ, I., VAZQUEZ, J. & REDONDO, J. M. 2006. Blockade of NFAT activation by the second calcineurin binding site. *The Journal of biological chemistry*, 281, 6227-35.
- MAZZOLAI, L., NUSSBERGER, J., AUBERT, J. F., BRUNNER, D. B., GABBIANI, G., BRUNNER, H. R. & PEDRAZZINI, T. 1998. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. *Hypertension*, 31, 1324-30.
- MEGURO, T., HONG, C., ASAI, K., TAKAGI, G., MCKINSEY, T. A., OLSON, E. N. & VATNER, S. F. 1999. Cyclosporine attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure. *Circulation research*, 84, 735-40.
- MEHTA, P. K. & GRIENDLING, K. K. 2007. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology*, 292, C82-97.
- MENDEZ-BARBERO, N., ESTEBAN, V., VILLAHOZ, S., ESCOLANO, A., URSO, K., ALFRANCA, A., RODRIGUEZ, C., SANCHEZ, S. A., OSAWA, T., ANDRES, V., MARTINEZ-GONZALEZ, J., MINAMI, T., REDONDO, J. M. & CAMPANERO, M. R. 2013. A major role for RCAN1 in atherosclerosis progression. *EMBO molecular medicine*, 5, 1901-17.
- MERVAALA, E., MULLER, D. N., PARK, J. K., DECHEND, R., SCHMIDT, F., FIEBELER, A., BIERINGER, M., BREU, V., GANTEN, D., HALLER, H. & LUFT, F. C. 2000. Cyclosporin A protects against angiotensin II-induced end-organ damage in double transgenic rats harboring human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension*, 35, 360-6.
- MICHALAK, M., FU, S. Y., MILNER, R. E., BUSAAN, J. L. & HANCE, J. E. 1996. Phosphorylation of the carboxyl-terminal region of dystrophin. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 74, 431-7.
- MILLER, L. W. 2002. Cardiovascular toxicities of immunosuppressive agents. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 2, 807-18.
- MINGUILLON, J., MORANCHO, B., KIM, S. J., LOPEZ-BOTET, M. & ARAMBURU, J. 2005. Concentrations of cyclosporin A and FK506 that inhibit IL-2 induction in human T cells do not affect TGF-beta1 biosynthesis, whereas higher doses of cyclosporin A trigger apoptosis and release of preformed TGF-beta1. *Journal of leukocyte biology*, 77, 748-58.
- MOLKENTIN, J. D. 2006. Dichotomy of Ca<sup>2+</sup> in the heart: contraction versus intracellular signaling. *The Journal of clinical investigation*, 116, 623-6.
- MOLKENTIN, J. D. 2013. Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: role of calcineurin-nuclear factor of activated T-cells. *Circulation research*, 113, 16-9.
- MOLKENTIN, J. D., LU, J. R., ANTOS, C. L., MARKHAM, B., RICHARDSON, J., ROBBINS, J., GRANT, S. R. & OLSON, E. N. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*, 93, 215-28.
- MURAT, A., PELLIEUX, C., BRUNNER, H. R. & PEDRAZZINI, T. 2000. Calcineurin blockade prevents cardiac mitogen-activated protein kinase activation and hypertrophy in renovascular hypertension. *The Journal of biological chemistry*, 275, 40867-73.
- NADAL-GINARD, B., KAJSTURA, J., LERI, A. & ANVERSA, P. 2003. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circulation research*, 92, 139-50.
- NEILSON, J. R., WINSLOW, M. M., HUR, E. M. & CRABTREE, G. R. 2004. Calcineurin B1 is essential for positive but not negative selection during thymocyte development. *Immunity*, 20, 255-66.
- NEMER, G. & NEMER, M. 2002. Cooperative interaction between GATA5 and NF-ATc regulates endothelial-endocardial differentiation of cardiogenic cells. *Development*, 129, 4045-55.
- NOLLY, M. B., CALDIZ, C. I., YEVES, A. M., VILLA-ABRILLE, M. C., MORGAN, P. E., AMADO MONDACA, N., PORTIANSKY, E. L., CHIAPPE DE CINGOLANI, G. E., CINGOLANI, H. E. &

- ENNIS, I. L. 2014. The signaling pathway for aldosterone-induced mitochondrial production of superoxide anion in the myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 67, 60-8.
- OCHIAI, T., NAKAJIMA, K., NAGATA, M., SUZUKI, T., ASANO, T., UEMATSU, T., GOTO, T., HORI, S., KENMOCHI, T., NAKAGOORI, T. & ET AL. 1987. Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplantation proceedings*, 19, 1284-6.
- OFLAZ, H., TURKMEN, A., KOCAMAN, O., ERDOGAN, D., MERIC, M., ONCUL, A., KOYLAN, N., YILMAZ, E., YILMAZ, C., SELCUKBIRICIK, F., KASIKCIOGLU, E. & SEVER, M. S. 2004. Is there a relation between duration of cyclosporine usage and right and left ventricular function in renal transplant patients? Tissue Doppler Echocardiography study. *Transplantation proceedings*, 36, 1380-4.
- OLSON, E. N. & WILLIAMS, R. S. 2000. Remodeling muscles with calcineurin. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22, 510-9.
- ORBAN, P. C., CHUI, D. & MARTH, J. D. 1992. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6861-5.
- OWUNWANNE, A., SHIHAB-ELDEEN, A., SADEK, S., JUNAID, T., YACOB, T. & ABDEL-DAYEM, H. M. 1993. Is cyclosporine toxic to the heart? *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 12, 199-204.
- PAN, M. G., XIONG, Y. & CHEN, F. 2013. NFAT gene family in inflammation and cancer. *Current molecular medicine*, 13, 543-54.
- PARK, S., UESUGI, M. & VERDINE, G. L. 2000. A second calcineurin binding site on the NFAT regulatory domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 7130-5.
- PARSONS, S. A., MILLAY, D. P., WILKINS, B. J., BUENO, O. F., TSIKA, G. L., NEILSON, J. R., LIBERATORE, C. M., YUTZEY, K. E., CRABTREE, G. R., TSIKA, R. W. & MOKKENTIN, J. D. 2004. Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*, 279, 26192-200.
- PARTRIDGE, J. B. & ANDERSON, R. H. 2009. Left ventricular anatomy: its nomenclature, segmentation, and planes of imaging. *Clinical anatomy*, 22, 77-84.
- PAUL, M., POYAN MEHR, A. & KREUTZ, R. 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological reviews*, 86, 747-803.
- PEDRAM, A., RAZANDI, M., AITKENHEAD, M. & LEVIN, E. R. 2005. Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1. *The Journal of biological chemistry*, 280, 26339-48.
- PIRAS, B. A., O'CONNOR, D. M. & FRENCH, B. A. 2013. Systemic delivery of shRNA by AAV9 provides highly efficient knockdown of ubiquitously expressed GFP in mouse heart, but not liver. *PloS one*, 8, e75894.
- PONTICELLI, C., CUCCHIARI, D. & GRAZIANI, G. 2011. Hypertension in kidney transplant recipients. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*, 24, 523-33.
- PRASAD, K. M., XU, Y., YANG, Z., ACTON, S. T. & FRENCH, B. A. 2011. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of AAV: in vivo gene delivery follows a Poisson distribution. *Gene therapy*, 18, 43-52.
- REUDELHUBER, T. L., BERNSTEIN, K. E. & DELAFONTAINE, P. 2007. Is angiotensin II a direct mediator of left ventricular hypertrophy? Time for another look. *Hypertension*, 49, 1196-201.

- REZZANI, R. 2006. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical studies. *Histology and histopathology*, 21, 301-16.
- RINNE, A., KAPUR, N., MOKKENTIN, J. D., POGWIZD, S. M., BERS, D. M., BANACH, K. & BLATTER, L. A. 2010. Isoform- and tissue-specific regulation of the Ca(2+)-sensitive transcription factor NFAT in cardiac myocytes and heart failure. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 298, H2001-9.
- ROCKMAN, H. A., WACHHORST, S. P., MAO, L. & ROSS, J., JR. 1994. ANG II receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and ANF gene expression with pressure overload in mice. *The American journal of physiology*, 266, H2468-75.
- RODRIGUEZ, A., ROY, J., MARTINEZ-MARTINEZ, S., LOPEZ-MADERUELO, M. D., NINO-MORENO, P., ORTI, L., PANTOJA-UCEDA, D., PINEDA-LUCENA, A., CYERT, M. S. & REDONDO, J. M. 2009. A conserved docking surface on calcineurin mediates interaction with substrates and immunosuppressants. *Molecular cell*, 33, 616-26.
- ROSENZWEIG, M., CONNOLE, M., GLICKMAN, R., YUE, S. P., NOREN, B., DEMARIA, M. & JOHNSON, R. P. 2001. Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood*, 97, 1951-9.
- ROTHERMEL, B., VEGA, R. B., YANG, J., WU, H., BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R. S. 2000. A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *The Journal of biological chemistry*, 275, 8719-25.
- ROTHERMEL, B. A., MCKINSEY, T. A., VEGA, R. B., NICOL, R. L., MAMMEN, P., YANG, J., ANTOS, C. L., SHELTON, J. M., BASSEL-DUBY, R., OLSON, E. N. & WILLIAMS, R. S. 2001. Myocyte-enriched calcineurin-interacting protein, MCIP1, inhibits cardiac hypertrophy in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 3328-33.
- ROULLET, J. B., XUE, H., MCCARRON, D. A., HOLCOMB, S. & BENNETT, W. M. 1994. Vascular mechanisms of cyclosporin-induced hypertension in the rat. *The Journal of clinical investigation*, 93, 2244-50.
- RUIZ-ORTEGA, M., LORENZO, O., SUZUKI, Y., RUPEREZ, M. & EGIDO, J. 2001. Proinflammatory actions of angiotensins. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 10, 321-9.
- RUIZ-ORTEGA, M., RODRIGUEZ-VITA, J., SANCHEZ-LOPEZ, E., CARVAJAL, G. & EGIDO, J. 2007. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovascular research*, 74, 196-206.
- RUSNAK, F. & MERTZ, P. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiological reviews*, 80, 1483-521.
- SADOSHIMA, J., XU, Y., SLAYTER, H. S. & IZUMO, S. 1993. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*, 75, 977-84.
- SAKATA, Y., MASUYAMA, T., YAMAMOTO, K., NISHIKAWA, N., YAMAMOTO, H., KONDO, H., ONO, K., OTSU, K., KUZUYA, T., MIWA, T., TAKEDA, H., MIYAMOTO, E. & HORI, M. 2000. Calcineurin inhibitor attenuates left ventricular hypertrophy, leading to prevention of heart failure in hypertensive rats. *Circulation*, 102, 2269-75.
- SANNA, B., BRANDT, E. B., KAISER, R. A., PFLUGER, P., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., VAN ROOIJ, E., DE WINDT, L. J., ROTHENBERG, M. E., TSCHOP, M. H., BENOIT, S. C. & MOKKENTIN, J. D. 2006. Modulatory calcineurin-interacting proteins 1 and 2 function as calcineurin facilitators in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 7327-32.
- SATA, M. & FUKUDA, D. 2010. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *The journal of medical investigation : JMI*, 57, 12-25.
- SAYGILI, E., RANA, O. R., MEYER, C., GEMEIN, C., ANDRZEJEWSKI, M. G., LUDWIG, A., WEBER, C., SCHOTTEN, U., KRUTTGEM, A., WEIS, J., SCHWINGER, R. H., MISCHKE, K., RASSAF, T.,

- KELM, M. & SCHAUERTE, P. 2009. The angiotensin-calcineurin-NFAT pathway mediates stretch-induced up-regulation of matrix metalloproteinases-2/-9 in atrial myocytes. *Basic research in cardiology*, 104, 435-48.
- SCHWARTZ, F., DUKA, A., DUKA, I., CUI, J. & GAVRAS, H. 2004. Novel targets of ANG II regulation in mouse heart identified by serial analysis of gene expression. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 287, H1957-66.
- SEKI, K., CHEN, H. C. & HUANG, K. P. 1995. Dephosphorylation of protein kinase C substrates, neurogranin, neuromodulin, and MARCKS, by calcineurin and protein phosphatases 1 and 2A. *Archives of biochemistry and biophysics*, 316, 673-9.
- SERNERI, G. G., BODDI, M., CECIONI, I., VANNI, S., COPPO, M., PAPA, M. L., BANDINELLI, B., BERTOLOZZI, I., POLIDORI, G., TOSCANO, T., MACCHERINI, M. & MODESTI, P. A. 2001. Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circulation research*, 88, 961-8.
- SEVERS, N. J. 2000. The cardiac muscle cell. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22, 188-99.
- SHUBEITA, H. E., MCDONOUGH, P. M., HARRIS, A. N., KNOWLTON, K. U., GLEMBOTSKI, C. C., BROWN, J. H. & CHIEN, K. R. 1990. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *The Journal of biological chemistry*, 265, 20555-62.
- SIMPSON, P. 1983. Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *The Journal of clinical investigation*, 72, 732-8.
- SMITH, B. K., COLLINS, S. W., CONLON, T. J., MAH, C. S., LAWSON, L. A., MARTIN, A. D., FULLER, D. D., CLEAVER, B. D., CLEMENT, N., PHILLIPS, D., ISLAM, S., DOBJIA, N. & BYRNE, B. J. 2013. Phase I/II trial of adeno-associated virus-mediated alpha-glucosidase gene therapy to the diaphragm for chronic respiratory failure in Pompe disease: initial safety and ventilatory outcomes. *Human gene therapy*, 24, 630-40.
- SOHAL, D. S., NGHIEM, M., CRACKOWER, M. A., WITT, S. A., KIMBALL, T. R., TYMITZ, K. M., PENNINGER, J. M. & MOLKENTIN, J. D. 2001. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circulation research*, 89, 20-5.
- STEWART, A. A., INGBRITSEN, T. S. & COHEN, P. 1983. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 5. Purification and properties of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase (2B) from rabbit skeletal muscle. *European journal of biochemistry / FEBS*, 132, 289-95.
- STRIECKE, R., CARMEN VILLACRES, M., SKELTON, D., SATAKE, N., HALENE, S. & KOHN, D. 1999. Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene therapy*, 6, 1305-12.
- SUN, L., YOUN, H. D., LOH, C., STOLOW, M., HE, W. & LIU, J. O. 1998. Cabin 1, a negative regulator for calcineurin signaling in T lymphocytes. *Immunity*, 8, 703-11.
- SUNDARESAN, N. R., GUPTA, M., KIM, G., RAJAMOCHAN, S. B., ISBATAN, A. & GUPTA, M. P. 2009. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119, 2758-71.
- SUSSMAN, M. A., LIM, H. W., GUDE, N., TAIGEN, T., OLSON, E. N., ROBBINS, J., COLBERT, M. C., GUALBERTO, A., WIECZOREK, D. F. & MOLKENTIN, J. D. 1998. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*, 281, 1690-3.
- TAIGEN, T., DE WINDT, L. J., LIM, H. W. & MOLKENTIN, J. D. 2000. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 1196-201.

- TAKEDA, Y., YONEDA, T., DEMURA, M., USUKURA, M. & MABUCHI, H. 2002. Calcineurin inhibition attenuates mineralocorticoid-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*, 105, 677-9.
- TAKEUCHI, K., ROEHRL, M. H., SUN, Z. Y. & WAGNER, G. 2007. Structure of the calcineurin-NFAT complex: defining a T cell activation switch using solution NMR and crystal coordinates. *Structure*, 15, 587-97.
- TAVI, P., PIKKARAINEN, S., RONKAINEN, J., NIEMELA, P., ILVES, M., WECKSTROM, M., VUOLTEENAHONEN, O., BRUTON, J., WESTERBLAD, H. & RUSKOAHONEN, H. 2004. Pacing-induced calcineurin activation controls cardiac Ca<sup>2+</sup> signalling and gene expression. *The Journal of physiology*, 554, 309-20.
- TEXTOR, S. C., CANZANELLO, V. J., TALER, S. J., WILSON, D. J., SCHWARTZ, L. L., AUGUSTINE, J. E., RAYMER, J. M., ROMERO, J. C., WIESNER, R. H., KROM, R. A. & ET AL. 1994. Cyclosporine-induced hypertension after transplantation. *Mayo Clinic proceedings*, 69, 1182-93.
- TORRENT-GUASP, F., KOCICA, M. J., CORNO, A. F., KOMEDA, M., CARRERAS-COSTA, F., FLOTATS, A., COSIN-AGUILLAR, J. & WEN, H. 2005. Towards new understanding of the heart structure and function. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 27, 191-201.
- TOUYZ, R. M. & SCHIFFRIN, E. L. 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*, 52, 639-72.
- TSUKAMOTO, Y., MANO, T., SAKATA, Y., OHTANI, T., TAKEDA, Y., TAMAKI, S., OMORI, Y., IKEYA, Y., SAITO, Y., ISHII, R., HIGASHIMORI, M., KANEKO, M., MIWA, T., YAMAMOTO, K. & KOMURO, I. 2013. A novel heart failure mice model of hypertensive heart disease by angiotensin II infusion, nephrectomy, and salt loading. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 305, H1658-67.
- URSO, K., ALFRANCA, A., MARTINEZ-MARTINEZ, S., ESCOLANO, A., ORTEGA, I., RODRIGUEZ, A. & REDONDO, J. M. 2011. NFATc3 regulates the transcription of genes involved in T-cell activation and angiogenesis. *Blood*, 118, 795-803.
- VAN BERLO, J. H., MAILLET, M. & MOLKENTIN, J. D. 2013. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *The Journal of clinical investigation*, 123, 37-45.
- VEGA, R. B., ROTHERMEL, B. A., WEINHEIMER, C. J., KOVACS, A., NASEEM, R. H., BASSEL-DUBY, R., WILLIAMS, R. S. & OLSON, E. N. 2003. Dual roles of modulatory calcineurin-interacting protein 1 in cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 669-74.
- WALKER, C. A. & SPINALE, F. G. 1999. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 118, 375-82.
- WANG, H. G., PATHAN, N., ETHELL, I. M., KRAJEWSKI, S., YAMAGUCHI, Y., SHIBASAKI, F., MCKEON, F., BOBO, T., FRANKE, T. F. & REED, J. C. 1999. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*, 284, 339-43.
- WANG, X., CHOW, F. L., OKA, T., HAO, L., LOPEZ-CAMPISTROUS, A., KELLY, S., COOPER, S., ODENBACH, J., FINEGAN, B. A., SCHULZ, R., KASSIRI, Z., LOPASCHUK, G. D. & FERNANDEZ-PATRON, C. 2009. Matrix metalloproteinase-7 and ADAM-12 (a disintegrin and metalloproteinase-12) define a signaling axis in agonist-induced hypertension and cardiac hypertrophy. *Circulation*, 119, 2480-9.
- WERFEL, S., JUNGSMANN, A., LEHMANN, L., KSIENZYK, J., BEKEREDJIAN, R., KAYA, Z., LEUCHS, B., NORDHEIM, A., BACKS, J., ENGELHARDT, S., KATUS, H. A. & MULLER, O. J. 2014. Rapid and highly efficient inducible cardiac gene knockout in adult mice using AAV-mediated expression of Cre recombinase. *Cardiovascular research*, 104, 15-23.

- WEST, S. 1906. An Address ON DILATATION AND HYPERTROPHY OF THE HEART AND SOME OTHER POINTS IN CARDIAC PATHOLOGY: Delivered before the Eastbourne Medical Society. *British medical journal*, 1, 1455-8.
- WILKINS, B. J., DE WINDT, L. J., BUENO, O. F., BRAZ, J. C., GLASCOCK, B. J., KIMBALL, T. F. & MOKKENTIN, J. D. 2002. Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth. *Molecular and cellular biology*, 22, 7603-13.
- WILKINS, B. J. & MOKKENTIN, J. D. 2004. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and biophysical research communications*, 322, 1178-91.
- WU, H., ROTHERMEL, B., KANATOUS, S., ROSENBERG, P., NAYA, F. J., SHELTON, J. M., HUTCHESON, K. A., DIMAIO, J. M., OLSON, E. N., BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R. S. 2001. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *The EMBO journal*, 20, 6414-23.
- WU, X., CHANG, B., BLAIR, N. S., SARGENT, M., YORK, A. J., ROBBINS, J., SHULL, G. E. & MOKKENTIN, J. D. 2009. Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase isoform 4 antagonizes cardiac hypertrophy in association with calcineurin inhibition in rodents. *The Journal of clinical investigation*, 119, 976-85.
- WU, X., ZHANG, T., BOSSUYT, J., LI, X., MCKINSEY, T. A., DEDMAN, J. R., OLSON, E. N., CHEN, J., BROWN, J. H. & BERS, D. M. 2006. Local InsP<sub>3</sub>-dependent perinuclear Ca<sup>2+</sup> signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *The Journal of clinical investigation*, 116, 675-82.
- XANTHOUDAKIS, S., VIOLA, J. P., SHAW, K. T., LUO, C., WALLACE, J. D., BOZZA, P. T., LUK, D. C., CURRAN, T. & RAO, A. 1996. An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, 272, 892-5.
- XIA, Y., MCMILLIN, J. B., LEWIS, A., MOORE, M., ZHU, W. G., WILLIAMS, R. S. & KELLEMS, R. E. 2000. Electrical stimulation of neonatal cardiac myocytes activates the NFAT3 and GATA4 pathways and up-regulates the adenylosuccinate synthetase 1 gene. *The Journal of biological chemistry*, 275, 1855-63.
- XU, J., CARRETERO, O. A., LIAO, T. D., PENG, H., SHESELY, E. G., LIU, T. S., YANG, J. J., REUDELHUBER, T. L. & YANG, X. P. 2010. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 299, H1328-38.
- YAGI, S., AIHARA, K., IKEDA, Y., SUMITOMO, Y., YOSHIDA, S., ISE, T., IWASE, T., ISHIKAWA, K., AZUMA, H., AKAIKE, M. & MATSUMOTO, T. 2008. Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts eNOS-independent protective actions against angiotensin II induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency. *Circulation research*, 102, 68-76.
- YANG, J., ROTHERMEL, B., VEGA, R. B., FREY, N., MCKINSEY, T. A., OLSON, E. N., BASSEL-DUBY, R. & WILLIAMS, R. S. 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circulation research*, 87, E61-8.
- YANG, M., ZHENG, J., MIAO, Y., WANG, Y., CUI, W., GUO, J., QIU, S., HAN, Y., JIA, L., LI, H., CHENG, J. & DU, J. 2012. Serum-glucocorticoid regulated kinase 1 regulates alternatively activated macrophage polarization contributing to angiotensin II-induced inflammation and cardiac fibrosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32, 1675-86.
- YLA-HERTTUALA, S. 2012. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 20, 1831-2.
- YOSHIDA, H., NISHINA, H., TAKIMOTO, H., MARENGERE, L. E., WAKEHAM, A. C., BOUCHARD, D., KONG, Y. Y., OHTEKI, T., SHAHINIAN, A., BACHMANN, M., OHASHI, P. S., PENNINGER, J.

- M., CRABTREE, G. R. & MAK, T. W. 1998. The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity*, 8, 115-24.
- ZHANG, W., KOWAL, R. C., RUSNAK, F., SIKKINK, R. A., OLSON, E. N. & VICTOR, R. G. 1999. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circulation research*, 84, 722-8.
- ZHANG, W., LI, J. L., HOSAKA, M., JANZ, R., SHELTON, J. M., ALBRIGHT, G. M., RICHARDSON, J. A., SUDHOF, T. C. & VICTOR, R. G. 2000. Cyclosporine A-induced hypertension involves synapsin in renal sensory nerve endings. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9765-70.
- ZHANG, W. & VICTOR, R. G. 2000. Calcineurin inhibitors cause renal afferent activation in rats: a novel mechanism of cyclosporine-induced hypertension. *American journal of hypertension*, 13, 999-1004.